

**ESTUDIO DE LA FRACCIÓN INSAPONIFICABLE OBTENIDA DEL ACEITE  
EXTRAIDO DE LA SEMILLA DE LA *Luffa Cylindrica***

**JUIANA FERNANDEZ TENORIO  
LUISA F. ARCILA GONZÁLEZ**

**UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA  
FACULTAD DE TECNOLOGÍA  
ESCUELA DE TECNOLOGÍA QUÍMICA  
PEREIRA  
2008**

**ESTUDIO DE LA FRACCION INSAPONIFICABLE OBTENIDA DEL ACEITE  
EXTRAIDO DE LA SEMILLA DE LA *Luffa Cylindrica***

**JULIANA FERNANDEZ TENORIO  
LUISA F. ARCILA GONZÁLEZ**

**Trabajo de grado como requisito parcial para optar el título de Tecnólogo  
Químico**

**Directora  
Gloria Edith Guerrero Álvarez  
Grupo Oleoquímica UTP**

**UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA  
FACULTAD DE TECNOLOGÍA  
ESCUELA DE TECNOLOGÍA QUÍMICA  
PEREIRA  
2008**

## **DEDICATORIA**

**Gracias a Dios por brindarnos la oportunidad de crecer personal, intelectual y profesionalmente en cada momento de nuestras vidas; a nuestros padres por su apoyo incondicional y total confianza en nosotras.**

## **AGRADECIMIENTOS**

A nuestras familias, por hacer realidad este gran logro que nos señala un mejor camino a seguir.

A la doctora Gloria Guerrero por brindarnos su apoyo en todo momento sin importar las circunstancias.

A nuestros amigos por estar presentes para darnos una voz de aliento.

A CENICAFE por prestarnos sus servicios de manera desinteresada.

A CENIPALMA por su gran ayuda en nuestro desempeño de análisis a realizar.

A ESTROCOL por su aporte fundamental de materia prima para el desarrollo total de nuestro trabajo de grado.

## CONTENIDO

pág.

<b>LISTA DE TABLAS .....</b>	<b>I</b>
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>II</b>
<b>LISTA DE ANEXOS .....</b>	<b>IV</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>V</b>
<b>JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....</b>	<b>2</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>3</b>
2.1 OBJETIVO GENERAL .....	3
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	3
<b>3. ANTECEDENTES.....</b>	<b>4</b>
3.1 DESCRIPCIÓN DE LA <i>LUFFA CYLINDRICA</i> .....	4
3.2 USOS DE LA <i>LUFFA CYLINDRICA</i> A NIVEL INTERNACIONAL.....	5
3.3 <i>LUFFA CYLINDRICA</i> EN COLOMBIA.....	5
3.3.1 PROCESO DE BENEFICIO DE LA <i>LUFFA CYLINDRICA</i> .....	5
3.3.2 USOS DE LA <i>LUFFA CYLINDRICA</i> .....	6
3.3.3 ESTUDIOS PREVIOS DE LA <i>LUFFA CYLINDRICA</i> REALIZADOS EN RISARALDA .....	7
3.3.3.1 COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA FIBRA DE LA <i>LUFFA</i> <i>CYLINDRICA</i> .....	7
3.3.3.2 CARACTERIZACIÓN FÍSICA Y QUÍMICA DEL ACEITE DE LAS SEMILLAS DE LA <i>LUFFA CYLINDRICA</i> .....	7
3.3.3.3 PROPIEDADES MICROBIOLÓGICAS DEL ACEITE DE LAS SEMILLAS DE LA <i>LUFFA CYLINDRICA</i> .....	8
<b>4. MARCO TEÓRICO .....</b>	<b>9</b>
4.1 LÍPIDOS.....	9
4.2 MATERIA INSAPONIFICABLE.....	9
4.3 FITOESTEROLES .....	10
4.3.1 SITOSTEROL .....	11
4.3.2 ESTIGMASTEROL.....	11
4.3.3 CAMPESTEROL.....	12
4.4 VITAMINAS.....	12
4.4.1 HIDROSOLUBLES.....	13

4.4.2 LIPOSOLUBLES.....	13
4.4.2.1 VITAMINA A.....	13
4.4.2.2 VITAMINA E .....	14
4.5 CAROTENOS .....	15
4.6 TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS .....	17
4.6.1 CROMATOGRAFÍA EN CAPA DELGADA (CCD).....	17
4.6.2 ADSORBENTES Y REVELADORES.....	18
4.6.2.1 ADSORBENTES.....	18
4.6.2.2 REVELADORES.....	19
4.6.3 CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA.....	19
4.6.4 SEPARACIÓN EN FASE SÓLIDA (SFS).....	20
4.6.5 CROMATOGRAFÍA DE GASES (CG).....	20
4.6.5.1 DETECTORES.....	21
4.6.6 CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS (GC/MS).....	22
4.6.7 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA (HPLC).....	23
4.6.8 DETECTORES.....	24
<b>5. METODOLOGÍA.....</b>	<b>26</b>
5.1 PRETRATAMIENTO DE LA MUESTRA.....	26
5.2 EXTRACCIÓN DEL ACEITE.....	26
5.3 OBTENCIÓN DE LA MATERIA INSAPONIFICABLE.....	26
5.4 ANÁLISIS DE FITOESTEROLES.....	26
5.5 CARACTERIZACIÓN PRELIMINAR DE LOS FITOESTEROLES POR CROMATOGRAFÍA DE CAPA DELGADA.....	28
5.6 CARACTERIZACIÓN DE LA FRACCIÓN DE FITOESTEROLES POR CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A UN ESPECTROFOTÓMETRO DE MASAS (CG-EM).....	28
5.7 ANÁLISIS DE VITAMINA E.....	29
5.8 ANÁLISIS DE $\beta$ -CAROTENO.....	29
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>30</b>
6.1 DESCRIPCIÓN DEL ACEITE .....	30
6.2 DESCRIPCIÓN DE LA MATERIA INSAPONIFICABLE .....	31
6.3 CUANTIFICACIÓN DE LA MATERIA INSAPONIFICABLE .....	31
6.4 CARACTERIZACIÓN DE LA FRACCIÓN DE FITOESTEROLES OBTENIDA POR SEPARACIÓN EN FASE SÓLIDA.....	32
6.4.1 CARACTERIZACIÓN PRELIMINAR POR CROMATOGRAFÍA EN CAPA DELGADA .....	32
6.4.1.1 SISTEMA 1 (HEXANO: ACETATO DE ETILO).....	32
6.4.1.2 SISTEMA 2 (HEXANO-DICLOROMETANO).....	33
6.4.2 CARACTERIZACIÓN DE FITOESTEROLES POR CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS.....	34
6.5 ANÁLISIS DE VITAMINA E.....	37
6.6 ANÁLISIS DE $\beta$ -CAROTENO.....	39

<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>42</b>
<b>RECOMENDACIONES .....</b>	<b>43</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>44</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>71</b>

## LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Composición química de la <i>Luffa</i> <i>Cylindrica</i> .....	7
Tabla 2. Caracterización física y química del aceite de las semillas de <i>Luffa</i> <i>Cylindrica</i> .....	7
Tabla 3. Propiedades microbiológicas del aceite de las semillas de la <i>Luffa</i> <i>Cylindrica</i> .....	8
Tabla 4. Sistemas de separación en fase sólida.....	27
Tabla 5. Determinación de la cantidad de aceite contenido en las semillas de la <i>Luffa Cylindrica</i> .....	30
Tabla 6. Determinación de la materia insaponificable.....	31
Tabla 7. Análisis composicional por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas de la fracción en Acetato de Etilo (F2) de la materia insaponificable del aceite de las semillas de la <i>Luffa Cylindrica</i> .....	34
Tabla 8. Resultados de la cuantificación de vitamina E en el aceite de las semillas de la <i>Luffa Cylindrica</i> .....	39
Tabla 9. Resultados de la cuantificación de Carotenos en el aceite de las semillas de la <i>Luffa Cylindrica</i> .....	40
Tabla 10. Características de los adsorbentes para CCD.....	44



## LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Frutos, cultivo y flor de la <i>Luffa Cylindrica</i> .....	4
Figura 2. Frutos en buen y mal estado.....	5
Figura 3. Artículos de ESTROCOL.....	6
Figura 4. Estructura básica de los triglicéridos. Los radicales (R1, R2, y R3) consisten de una cadena de carbonos de longitud y saturación variable.....	9
Figura 5. Molécula de los fitoesteroles .....	10
Figura 6. Molécula del Sitosterol .....	11
Figura 7. Molécula del Estigmasterol.....	12
Figura 8. Molécula del Campesterol .....	12
Figura 9. Molécula Vitamina A.....	14
Figura 10. Reacción de la actividad antioxidante para el tocoferol.....	14
Figura 11. Molécula Vitamina E.....	15
Figura 12. Moléculas de Carotenos.....	16
Figura 13. Representación esquemática de un cromatógrafo de gases.....	20
Figura 14. Semillas <i>Luffa Cylindrica</i> .....	26
Figura 15. Microcolumna de fraccionamiento.....	27
Figura 16. Aceite de las semillas de la <i>Luffa Cylindrica</i> .....	30
Figura 17. Materia Insaponificable.....	31
Figura 18. Separación por CCD de fracciones obtenidas por separación en fase sólida S1, donde E es el eluyente con que se eluyeron las placas (Hexano: Éter	

etílico: Ácido Acético 8: 2: 0.1), A es el revelador de Vapores de Yodo y B es el revelador Ácido Fosfomolibdico.....32

Figura 19. Fracciones obtenidas por separación en fase sólida S2, donde E es el eluyente con que se eluyeron las placas (Hexano: Éter etílico: Ácido Acético 8: 2: 0.1), A es el revelador de Vapores de Yodo y B es el revelador Ácido Fosfomolibdico..... 33

Figura 20. A. Espectro de masas del compuesto Ergosta-7,22-dien-3-ol,(3.beta.,5.alpha) con tr 28.780 min. B. Principales fragmentos del espectro de masas del Ergosta-7,22-dien-3-ol,(3.beta.,5.alpha).....35

Figura 21. A. Espectro de masas del compuesto Lanosterol con tr 30.296 min. B. Principales fragmentos del espectro de masas del Lanosterol..... 36

Figura 22. Perfil cromatográfico de Vitamina E en el aceite de las semillas de la *Luffa Cylindrica*.....38

Figura 23. Perfil cromatográfico de Carotenos en el aceite de las semillas de la *Luffa Cylindrica*.....39

Figura 24. Cromatoplasas Sistema 1. (a) E1, vapores de Yodo como revelador. (b) E1, Ácido Fosfomolibdico como revelador.....46

Figura 25. Cromatoplasas Sistema 2. (a), E1, Vapores de Yodo como revelador (b), E1, Ácido Fosfomolibdico como revelador..... 47

Figura 26. Cromatograma de gases de la fracción de Acetato de Etilo (F2).....48

Figura 27. Espectro de masas de compuestos identificados y su comparación con la librería del equipo.....70

## LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 1 .....	44
Anexo 2 .....	45
Anexo 3 .....	46
Anexo 4 .....	47
Anexo 5 .....	48
Anexo 6 .....	49

## RESUMEN

Se obtuvo y caracterizó la materia insaponificable del aceite de las semillas de la *Luffa Cylindrica* procedentes de Risaralda suministrada por la empresa ESTROCOL. La materia prima se sometió a un proceso de secado para la posterior extracción del aceite por el método soxhlet, empleando Hexano como solvente.

La saponificación del aceite obtenido y la cuantificación de la materia insaponificable se determinó según Norma Técnica Colombiana NTC 235-2.

El fraccionamiento se realizó empleando separación en fase sólida y dos sistemas de solventes: Hexano-Acetato de Etilo y Hexano-Diclorometano; donde las fracciones obtenidas fueron analizadas por cromatografía en capa delgada para observar la separación de los compuestos esterólicos para su posterior análisis.

La caracterización de la materia insaponificable se hizo por cromatografía de gases acoplado a masas, dando como resultado la posible presencia de fitoesteroles (Lanosterol (10.96%) y Ergosta-7,22-dien-3-ol,(3.beta.,5.alpha) (15.06%)) como componentes mayoritarios.

Adicionalmente se determinó el contenido de vitamina E y  $\beta$ -Caroteno en el aceite de las semillas de la *Luffa Cylindrica*, empleando cromatografía líquida de alta eficiencia como método analítico; obteniéndose un valor de 621 ppm para Vitamina E y de 58 ppm para  $\beta$ -Caroteno.

Los resultados obtenidos fueron comparados con aceites de origen vegetal y animal.

## JUSTIFICACIÓN

La *Luffa Cylindrica* es una enredadera vigorosa de ciclo anual de la familia de las *Cucurbitaceas*, del género *Luffa* y es originaria de las regiones tropicales de América, en Colombia se le conoce con el nombre de estropajo, (1).

Hay algunas variedades de esponja como son la *Luffa Acutangula*, la *Luffa Aegyptica (Cylindrica)* y una variedad de esta última que es la *Luffa Cylindrica* de metro. Sin embargo es la *Luffa Cylindrica* de un tamaño comprendido entre los 25 y los 35 cm de longitud la que tiene mayor aceptación, (2).

ESTROCOL es la empresa Colombiana que a nivel regional (Risaralda) se encarga de la elaboración de productos a partir de la enredadera de la *Luffa Cylindrica*, de la cual se desecha por completo sus semillas a pesar de que se ha comprobado que el aceite proveniente de ellas es de alto beneficio para la cosmética como lo son cremas antiinflamatorias, protectores de quemaduras causadas por los rayos UV, tratamientos para el cabello, (3, 4, 5).

Para que el aceite proveniente de las semillas de la *Luffa Cylindrica* sea de gran interés y de mayor uso en Colombia, es necesario realizarle pruebas detalladas para determinar la presencia de algunos antioxidantes como lo son la vitamina A y vitamina E, además de analizar en su materia insaponificable la existencia de algunos de los principales fitoesteroles, pues todos estos serían de gran utilidad para darle valor agregado al aceite que lo hacen apto desde el punto de vista cosmético y hasta terapéutico, (3).

Sin embargo, no se debe olvidar que este aceite se viene utilizando en aplicaciones cosméticas, pero en Colombia donde se cultiva la *Luffa Cylindrica* y se desecha toda su semilla no se conoce, lo cual demuestra que la información es escasa y que es de gran importancia realizarle un estudio que genere un soporte científico que demuestre el por qué este aceite tiene diversos beneficios.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

ESTROCOL es una empresa nacional que por muchos años se ha encargado de transformar la *Luffa Cylindrica* en productos de diversas utilidades en la parte de aseo personal, teniendo gran acogida a nivel nacional e internacional.

De esta enredadera se aprovecha únicamente el fruto, generándose subproductos sin uso actual como el mucílago y las semillas. En la Universidad Tecnológica de Pereira el grupo de Oleoquímica viene realizando estudios de las semillas de la *Luffa Cylindrica* con el fin de evaluar el uso del aceite como potencial insumo en la industria cosmética, (6); además, se han adelantado estudios sobre la caracterización física y química del aceite, (7), así como de su cumplimiento según la normatividad microbiológica exigida a este tipo de insumos, (8), sin olvidar los análisis realizados a la torta residual en su posible uso animal, (7).

Con miras a obtener el mayor valor agregado del aceite para su disposición en la industria, se ha considerado su uso cosmético. Para soportar científicamente esta aplicación se requiere mostrar que esta materia prima esta enriquecida en componentes como antioxidantes que tienen un gran número de beneficios. Por esto es necesario un estudio que evalúe la presencia y contenido de los principales antioxidantes en el aceite de las semillas de la *Luffa Cylindrica* cultivada en Colombia que le den soporte a esta materia prima.

## OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GENERAL.

Caracterizar los principales compuestos presentes en la materia insaponificable del aceite de las semillas de la *Luffa Cylindrica*.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Extraer el aceite de las semillas de la *Luffa Cylindrica* y evaluar su porcentaje de rendimiento.
- Obtener la materia insaponificable del aceite de las semillas de la *Luffa Cylindrica* y calcular su porcentaje de rendimiento.
- Caracterizar los principales fitoesteroles en la fracción insaponificable.
- Evaluar la presencia de  $\beta$ -Caroteno presente en el aceite de las semillas de la *Luffa Cylindrica*.
- Analizar el contenido de Vitamina E en el aceite de las semillas de la *Luffa Cylindrica*.

### 3- ANTECEDENTES

#### 3.1 DESCRIPCIÓN DE LA *LUFFA CYLINDRICA*

La *Luffa Cylindrica* (*Estropajo*) es una enredadera vigorosa de ciclo anual de la familia de las *Cucurbitaceas*, del género *Luffa* y es originaria de las regiones tropicales de América; cuyo sistema radicular consta de una raíz principal y raíces secundarias con abundante cantidad de pelos. Los tallos son herbáceos, sólidos cuando jóvenes y huecos al madurar, pueden llegar a medir hasta 15m de longitud, de características trepadoras; al ser una especie monoica, presenta en forma separada las flores masculinas y femeninas. Una adecuada polinización produce frutos cilíndricos, mientras que una mala polinización por la falta de polen en una de las "ramas" del estigma produce frutos deformes. Ellos en su estado tierno, son suaves y verdes, externamente marcados por líneas longitudinales oscuras, (figura 1). En su interior presentan una red cerrada de fibras, (1).

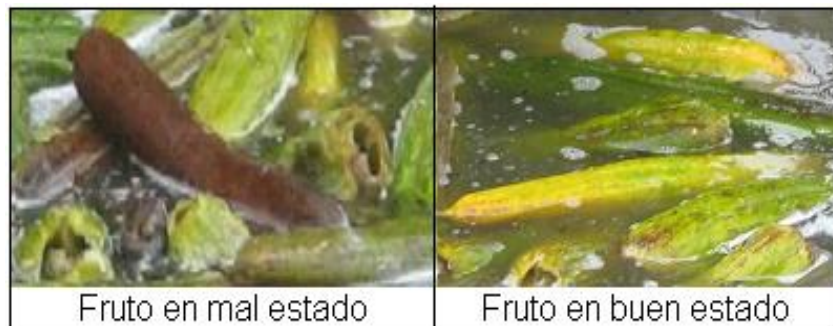


**Figura 1.** Frutos, cultivo y flor de la *Luffa Cylindrica*.

Para garantizar una buena cosecha se debe comenzar su recolección (manual) entre el cuarto y quinto mes de crecimiento de la planta, tiempo en el cual los frutos se tornan de color amarillo y su extremo distal de color naranja, (figura 2). Sin embargo, se debe evitar al máximo una coloración café en el fruto, pues esto indica que se encuentra en mal estado y sus fibras no son tan resistentes, (1, 9).

El Estropajo requiere de una buena variedad de climas para su buen desarrollo, con temperaturas entre los 18°C y los 25°C, y alturas sobre el nivel del mar entre 1000 y 1500m con buena luminosidad y buen régimen de lluvias.





**Figura 2.** Frutos en buen y mal estado.

### **3.2 USOS DE LA *LUFFA CYLINDRICA* A NIVEL INTERNACIONAL**

La *Luffa cylindrica* se ha destacado a nivel internacional por tener grandes aplicaciones que van desde lo medicinal, nutricional hasta lo cosmético, (3, 4, 5).

Debido a la economía y tecnología mas avanzada de otros países, se han podido realizar estudios con mayor profundidad de los beneficios de la *Luffa cylindrica*, encontrando de esta manera que sus fibras no son las únicas con grandes utilidades, sino que el aceite proveniente de sus semillas también es de gran aporte en la parte nutricional como ayuda para el control del colesterol, (10), y en la parte cosmética como preventor de arrugas, quemaduras, cayos, tratamientos para el cabello, etc, (3, 4, 5).

Sin embargo, también se debe resaltar que la fibra de *Luffa cylindrica* tiene múltiples usos, entre ellos se pueden mencionar las suelas para zapatillas, rellenos para las industrias mobiliarias y textiles, base para cierta variedad de papel, filtros para piscinas, filtros para agua y aceite; en Norte América y Japón es considerada como excelente filtro en calderas de buques, locomotoras y en grandes fábricas con equipos a vapor. También se utilizan para la elaboración de artículos de artesanía y floristería; como pulidor, para producir cartón, como aislante, y hasta para la salud e higiene personal, (11).

### **3.3 *LUFFA CYLINDRICA* EN COLOMBIA**

#### **3.3.1 PROCESO DE BENEFICIO DE LA *LUFFA CYLINDRICA***

Para algunos usos, la fibra requiere un proceso de beneficio que inicia al cortar los frutos tan pronto como maduran, lo cual puede conocerse por el amarillento de la corteza y por el color naranja más pronunciado de la extremidad inferior, luego se ponen en agua corriente por tiempo suficiente para que se descomponga la

corteza, después de lo cuál se lavan a mano, frotando un fruto contra otro o contra una pared hasta que estén limpios del todo, menos de las semillas que se quitarán después.

Las esponjas se extienden en alambres colocados a la sombra para que se sequen, y jamás al sol evitando la pérdida de la elasticidad. Antes de que estén completamente secas, se sacuden suavemente para extraer las semillas que están colocadas en los anillos interiores, (12).

### 3.3.2 USOS DE LA *LUFFA CYLINDRICA*

Debido a la extraordinaria calidad de sus fibras, estas han sido utilizadas en el mercado como estimulante externo para la circulación de la sangre y eliminación de impurezas, (1). Además su agradable apariencia permite que la *Luffa Cylindrica* sea empleada para la fabricación de adornos para el hogar, (9).

El aceite proveniente de las semillas de la *Luffa Cylindrica* tiene excelentes propiedades antioxidantes que permiten que sea utilizado en productos como cremas humectantes, protectores solares, jabones, entre otros, (5).

ESTROCOL es una empresa que a nivel nacional se ha encargado de distribuir toda una línea de artículos, (figura 3) como lo son: estropajo entero, discos faciales, esponjillas, almohadillas, guantes masajeadores, pomos, jaboneras, sandalias, adornos navideños y cremas exfoliantes con estropajo molido, (9).



**Figura 3.** Artículos de ESTROCOL.

### 3.3.3 ESTUDIOS PREVIOS DE LA *LUFFA CYLINDRICA* REALIZADOS EN RISARALDA

#### 3.3.3.1 COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA FIBRA DE LA *LUFFA CYLINDRICA*

Composición química de la <i>Luffa Cylindrica</i>		
Elemento	Materia Original (%)	Materia libre en agua (%)
Agua	94.66	-
Grasa	0.19	3.72
Carbohidratos	3.31	61.99
Fibra	0.46	8.58
Ceniza	0.41	7.65
Indeterminados	0.45	8.49
Proteínas	0.51	9.57
En cuanto a las semillas es considerable su contenido de aceite		

**Tabla 1.** Composición química de la *Luffa Cylindrica*, (12).

#### 3.3.3.2 CARACTERIZACIÓN FÍSICA Y QUÍMICA DEL ACEITE DE LAS SEMILLAS DE LA *LUFFA CYLINDRICA*

Propiedades físicas del aceite de las semillas de la <i>Luffa Cylindrica</i>	
Índice de refacción $n_D^{20}$	1.4677
Densidad	0.9045 g/mL
Propiedades químicas del aceite de las semillas de la <i>Luffa Cylindrica</i>	
Índice de acidez	0.319 % Ac. Oleico – 0.227% Ac Laurico
Índice de peróxidos	0
Índice de saponificación	192.182 meq/Kg
Índice de yodo	70.016 cg/g

**Tabla 2.** Caracterización física y química del aceite de las semillas de *Luffa Cylindrica*, (7).

También se realizó una caracterización de los metales presentes en la torta, (7), encontrando que el potasio, magnesio y fósforo se encuentran en cantidades apreciables, además se presenta como componente mayoritario el nitrógeno (no metal) en un porcentaje de 6.31%, con lo que se puede considerar que la torta resultante de las semillas, es apta para el uso como fertilizante orgánico.

### 3.3.3.3 PROPIEDADES MICROBIOLÓGICAS DEL ACEITE DE LAS SEMILLAS DE LA *LUFFA CYLINDRICA*

Caracterización del aceite fresco de las semillas de la <i>Luffa Cylindrica</i>			
MICROORGANISMO	NTC 4833, (5).		CUMPLE
	Cosméticos para bebe, (UFC/ml).	Cosméticos en general, (UFC/ml).	
Mesófilos	<100	<1000	NO
Mohos y levaduras	<100.	<1000	NO
Coliformes totales	Ausencia total	Ausencia total	SI
Coliformes fecales ( <i>E. coli</i> )	Ausencia total	Ausencia total	SI
<i>S. aureus</i>	Ausencia total	Ausencia total	NO

**Tabla 3.** Propiedades microbiológicas del aceite de las semillas de la *Luffa Cylindrica*, (8).

En la tabla 3 se observa que el aceite de las semillas de *Luffa Cylindrica* no cumple en la totalidad con la NTC 4833, (13), pues el recuento de *mesófilos*, *mohos y levaduras* y *Staphylococcus aureus*, sobrepasan el límite establecido.

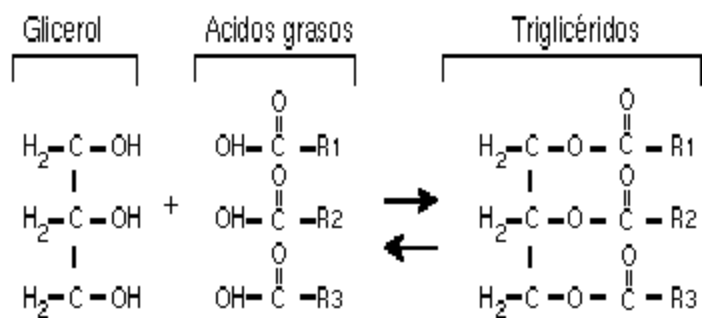
## 4- MARCO TEÓRICO

### 4.1 LÍPIDOS

Los lípidos son moléculas orgánicas que se encuentran en la naturaleza y que tienen una solubilidad limitada en agua, y que pueden aislarse a partir de organismos por extracción con disolventes orgánicos no polares. Se clasifican como lípidos las grasas, los aceites, las ceras, varias vitaminas y hormonas y la mayor parte de los componentes no proteínicos de las membranas celulares, (14).

Las grasas y los aceites son ésteres formados por tres ácidos grasos de 12 a 22 átomos de carbono y glicerol, estos ésteres se conocen generalmente como triglicéridos, (figura 4). Las grasas y los aceites no son triglicéridos sencillos, puesto que contienen ácidos grasos distintos distribuidos entre varias moléculas de glicéridos, sin olvidar que los aceites tienen un mayor contenido en triglicéridos de ácidos grasos insaturados que las grasas, (15).

Mediante hidrólisis se pueden obtener los ácidos grasos libres que conforman el triglicérido y dependiendo del ácido graso presente, se denomina el triglicérido, (16).



**Figura 4.** Estructura básica de los triglicéridos. Los radicales (R1, R2, y R3) consisten de una cadena de carbonos de longitud y saturación variable.

### 4.2 MATERIA INSAPONIFICABLE

La determinación de la materia insaponificable sirve para determinar la pureza de las grasas o aceites y para su evaluación. Incluye los componentes naturales insaponificables extraíbles con determinados solventes lipófilos, tales como esteroides, hidrocarburos, alcoholes, etc.

Se denomina fracción insaponificable a la suma de aquellos componentes de una grasa o aceite que se pesan como residuo no volátil después de la saponificación a partir de una disolución acuosa alcalina tras la extracción con Éter etílico o Éter de petróleo.

Las grasas se saponifican con Hidróxido de potasio metanólico y los insaponificables se extraen con Éter de petróleo a partir de la solución de jabón diluida, el residuo se pesa después de la evaporación del disolvente y posterior secado, (17).

### 4.3 FITOESTEROLES

Los fitoesteroles, (Figura 5) son triterpenos similares al colesterol, sin embargo, el colesterol tiene un lado de la cadena compuesto por ocho átomos de carbono, mientras que los fitoesteroles más comunes tienen una parte de la cadena compuesta por 9 ó 10 átomos de carbono, de un total de 28 a 29 átomos de carbono. Más de 100 tipos de fitoesteroles han sido reportados en especies de plantas, pero los más abundantes son el sitosterol, campesterol y estigmasterol. Los fitoesteroles desempeñan importantes funciones en varios ámbitos, a saber, el de la farmacéutica (producción de esteroides), la nutrición (anti-colesterol aditivos en los alimentos funcionales, las propiedades anti-cáncer), y los cosméticos (cremas, lápiz de labios), (18).

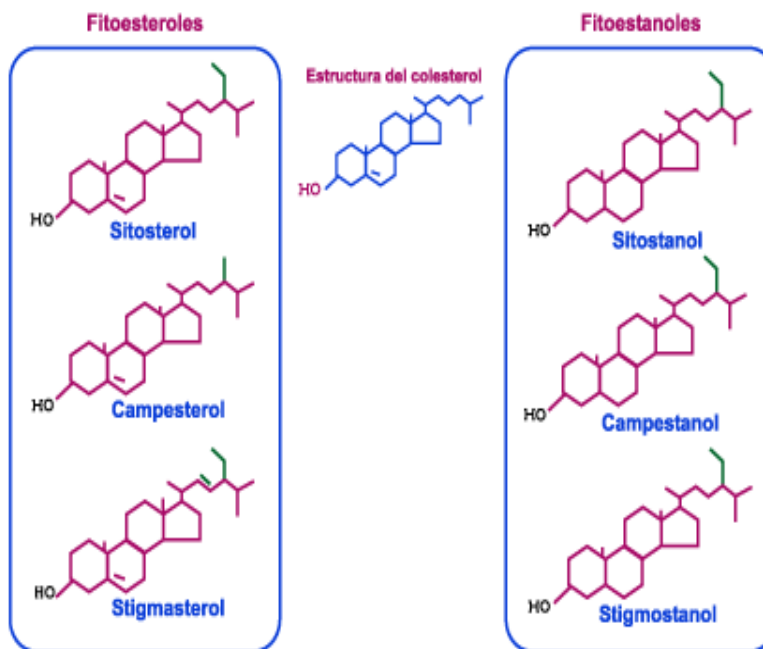
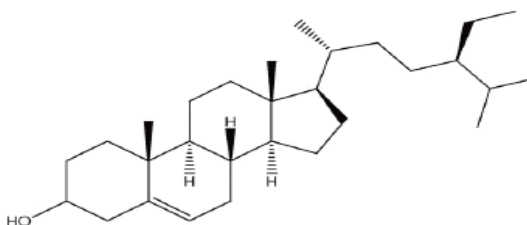


Figura 5. Molécula de los fitoesteroles

### 4.3.1 SITOSTEROL

Los esteroides de plantas, como los sitoesteroides, son constituyentes de creciente importancia en una dieta balanceada. Entre estos, el  $\beta$ -sitosterol es probablemente el más abundante y ampliamente distribuido. Este esteroide, relacionado estructuralmente con el colesterol, contiene un grupo  $\beta$ -etilo en el C-24 del esqueleto del colesterol, lo que lo hace más lipofílico, (figura 6). Los sitoesteroides de plantas han generado un considerable interés debido a su capacidad de disminuir el colesterol y a su utilidad terapéutica en el tratamiento de la hiperplasia prostática benigna. Varios estudios han demostrado la efectividad clínica de la fitoterapia basada en fitoesteroides (principalmente  $\beta$ -sitosterol) en el tratamiento de las patologías antes mencionadas, dando así soporte científico al uso tradicional y de larga data que se le ha dado en algunos países europeos, (19).



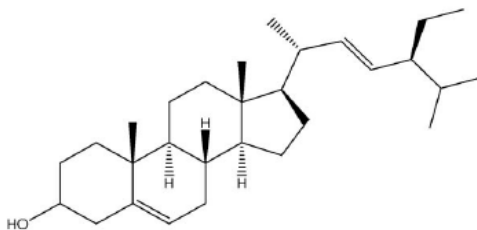
**SITOSTEROL**

**Figura 6.** Molécula del Sitosterol

### 4.3.2 ESTIGMASTEROL

El estigmasterol es un fitoesteroide con fórmula molecular  $C_{29}H_{48}O$ , (figura 7) que se produce en las plantas de soja, frijol Calabar, semillas y en una serie de hierbas medicinales, incluidas las chinas *Ophiopogon japonicus*, o *Mai hombres dong*, y el *ginseng* americano, también se encuentra en diversas hortalizas, legumbres, frutos secos y leche sin pasteurizar.

Se utiliza como un precursor en la fabricación sintética de la progesterona, una valiosa hormona humana que desempeña una importante función fisiológica en el tejido y la reconstrucción de los mecanismos relacionados con los estrógenos, actuando así como un intermediario en la biosíntesis de andrógenos, estrógenos, y corticoides, (20).



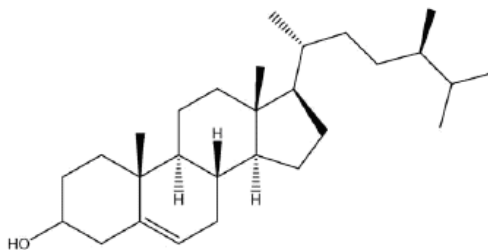
### ESTIGMASTEROL

**Figura 7.** Molécula del Estigmasterol.

#### 4.3.3 CAMPESTEROL

El campesterol es un compuesto vegetal con una estructura química, (figura 8) y funciones biológicas similares al colesterol. Debido a esta semejanza estructural, su acción principal reside en actuar como agente capaz de inhibir la absorción del colesterol.

Dentro de las propiedades benéficas del campesterol se han destacado las anticancerígenas, antiinflamatorias y antioxidantes, (21).



### CAMPESTEROL

**Figura 8.** Molécula del Campesterol.

#### 4.4 VITAMINAS

Las vitaminas son sustancias orgánicas imprescindibles en los procesos metabólicos que tienen lugar en la nutrición de los seres vivos. No aportan energía pero sin ellas, el organismo no es capaz de aprovechar los elementos constructivos y energéticos suministrados por la alimentación.

Normalmente se utilizan en el interior de las células como antecesoras de las coenzimas, a partir de las cuales se elaboran los miles de enzimas que regulan las reacciones químicas de las que viven las células porque su efecto consiste en ayudar a convertir los alimentos en energía, (22).



Las vitaminas se dividen en dos grandes grupos:

#### **4.4.1 HIDROSOLUBLES**

Las vitaminas hidrosolubles son aquellas que se disuelven en agua. Se trata de coenzimas o precursores de coenzimas, necesarias para muchas reacciones químicas del metabolismo.

El exceso de vitaminas hidrosolubles se eliminan por la orina, por lo que no tienen efecto tóxico aunque su consumo sea elevado, sin embargo, se podría sufrir anomalías en los riñones por no poder evacuar la totalidad de líquido.

Las vitaminas hidrosolubles son: VITAMINA C (Ácido Ascórbico. Antiescorbútica), VITAMINA B1 (Tiamina. Antiberibérica), VITAMINA B2 (Riboflavina), VITAMINA B3 (Niacina, Ácido Nicotínico, Vitamina PP, Antipelagrosa), VITAMINA B5 (Ácido Pantoténico, Vitamina W), VITAMINA B6 (Piridoxina), VITAMINA B8 (Biotina. Vitamina H), VITAMINA B9 (Ácido Fólico), VITAMINA B12 (Cobalamina).

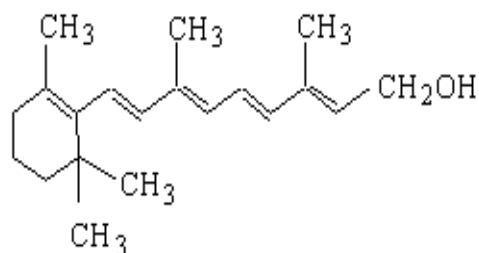
#### **4.4.2 LIPOSOLUBLES**

Son aquellas vitaminas que se disuelven en grasas y aceites, se almacenan en el hígado y en los tejidos grasos, por lo tanto no es necesario tomarlas todos los días, siendo posible subsistir una época sin su aporte.

Las vitaminas liposolubles son: Vitamina A (Retinol), Vitamina D (Calciferol), Vitamina E (Tocoferol) y Vitamina K (Antihemorrágica).

##### **4.4.2.1 VITAMINA A**

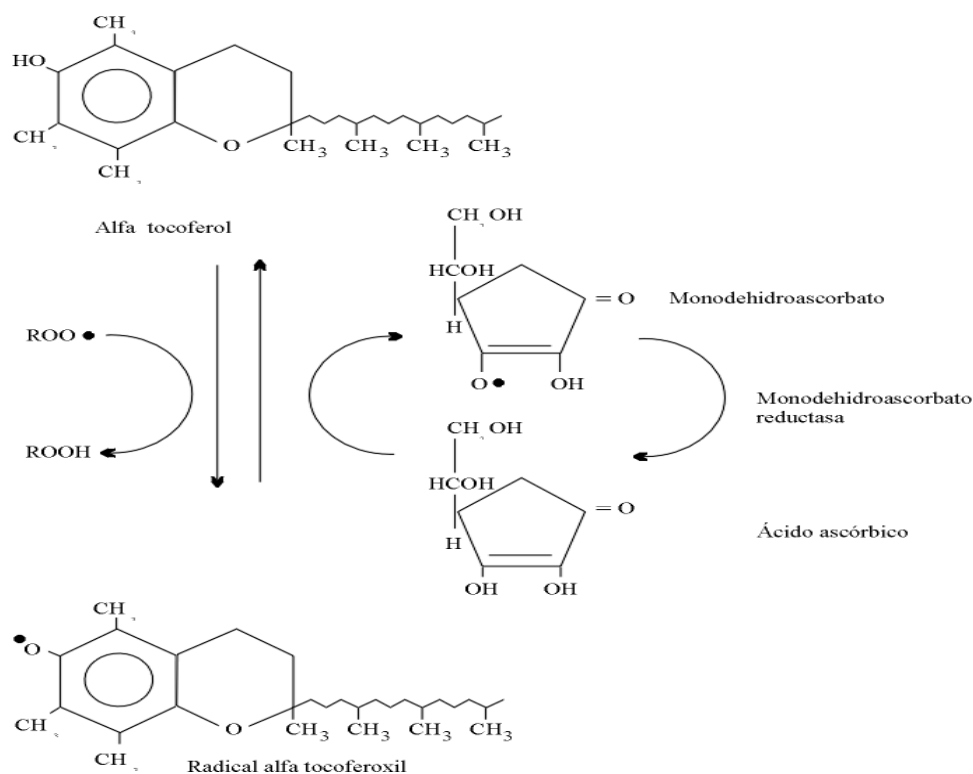
La vitamina A es un alcohol primario de color amarillo pálido conocida como retinol, se presenta de dos formas: la vitamina A1 y la vitamina A2. Está solo presente como tal en los alimentos de origen animal, aunque en los vegetales se encuentra como provitamina A, en forma de carotenos, los cuales se transforman en vitamina A en el cuerpo humano, (23). Se almacena en el hígado en grandes cantidades y también en el tejido graso de la piel (palmas de las manos y pies principalmente), por lo que se puede subsistir largos períodos sin su consumo, (24, 25). La vitamina A, (Figura 9) es necesaria para la visión, el crecimiento y el desarrollo del embrión. La ceguera es una causa común de la deficiencia de esta, (26).



**Figura 9.** Molécula Vitamina A.

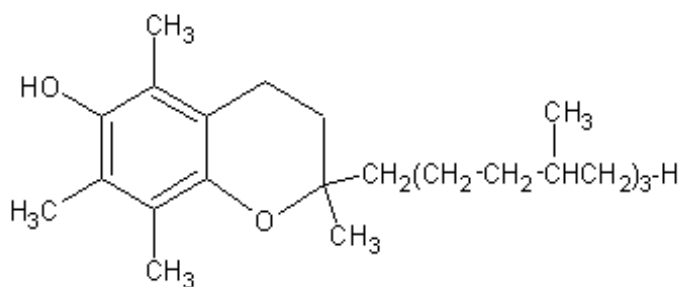
#### 4.4.2.2 VITAMINA E

Los tocoferoles y tocotrienoles son conocidos bajo el nombre genérico de vitamina E, (Figura 11). La actividad biológica de la vitamina E se muestra en los tocoferoles y tocotrienoles, especialmente alfa-tocoferol. La reacción predominante de la actividad antioxidante para el tocoferol es donar un átomo de Hidrógeno, donde un radical tocoferoxil es formado (Figura 10).



**Figura 10.** Reacción de la actividad antioxidante para el tocoferol, (27).

La vitamina E tiene efectos protectores entre las enfermedades coronarias debido a la inhibición de la oxidación del LDL, (28, 29). El alfa-tocoferol es un antioxidante, cuya función es estabilizar la actividad de los radicales libres resultantes de la oxidación de los ácidos grasos insaturados en las membranas celulares. Por lo tanto, el tocoferol puede teóricamente prevenir dos radicales libres peroxi de atacar otras cadenas de ácidos grasos y producir más radicales libres, (30). La participación de la vitamina E como antioxidante es de suma importancia en la prevención de enfermedades donde existe una destrucción de células importantes, protege a los tejidos de los efectos nocivos de las toxinas ambientales y del daño consecuente con los procesos metabólicos normales, contribuyendo a prevenir el envejecimiento de células y tejidos, protege a las membranas biológicas de nervios, músculos y sistema cardiovascular, ayuda a prolongar la vida de los glóbulos rojos, al organismo a lograr un óptimo uso de la vitamina A y evita los coágulos en las arterias, (31, 32, 33, 34).



**Figura 11.** Molécula Vitamina E.

#### 4.5 CAROTENOS

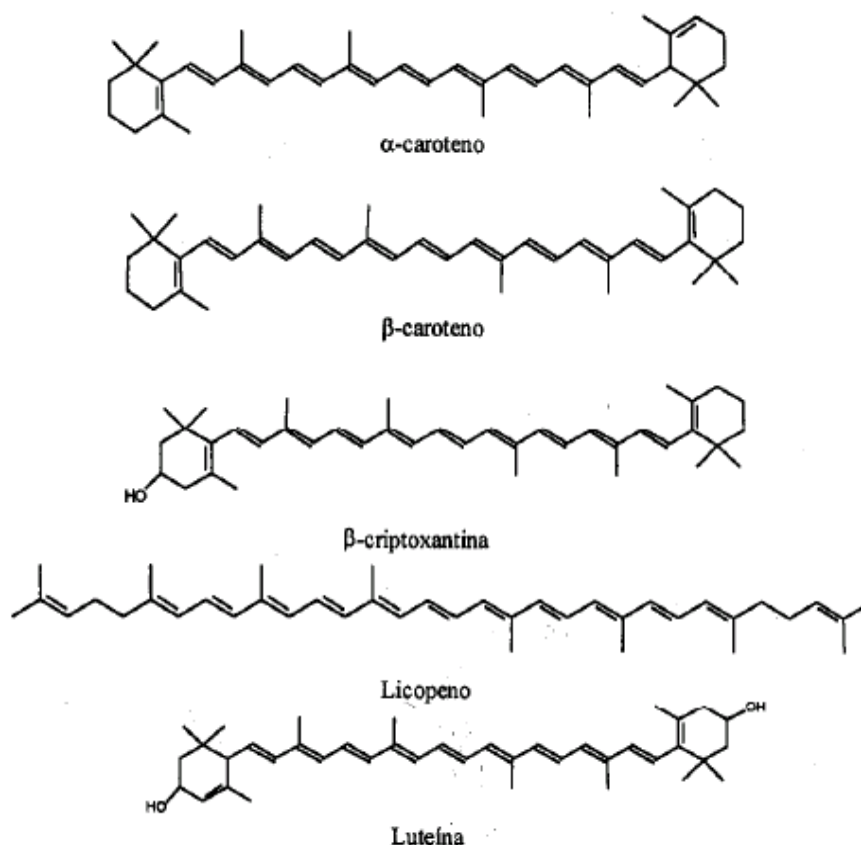
Los carotenos son un grupo de pigmentos vegetales liposolubles de color intenso (rojo, anaranjado y amarillo). Todos los organismos que dependen del sol para obtener energía, sean bacterias o plantas, contienen carotenos. Su efecto antioxidante hace que estos compuestos tengan un papel esencial para proteger a los organismos para que no sufran daños durante la fotosíntesis, (proceso de convertir la luz solar en energía química).

Las frutas y los vegetales constituyen las fuentes principales de los carotenos en la dieta humana, están presentes como micro-componentes y son responsables de sus colores amarillos, anaranjados y rojos.

Los carotenos son los responsables de las características beneficiosas en las frutas y vegetales, tales como la prevención de enfermedades, incluyendo las enfermedades cardiovasculares, cáncer y otras enfermedades crónicas.

En los últimos años se han identificado en la naturaleza alrededor de 600 carotenos, de los cuales 40 están presentes en la dieta humana, de estos 40 cerca de 20 se han encontrado en la sangre humana y tejidos finos. El 90% de los carotenos presentes en la dieta y el cuerpo humano se representan como  $\beta$ -Carotenos,  $\alpha$ -Carotenos, luteína, licopeno y criptoxantina (figura 12). No se puede olvidar que a raíz de esto se han intensificado las investigaciones sobre las propiedades antioxidantes de los carotenos, (35).

Los carotenos son pigmentos amarillos, naranjas y rojos presentes en muchas frutas y verduras. Varios de ellos son precursores de Vitamina A (ej. Beta-caroteno, gamma-caroteno y beta-criptoxantina) y debido a sus dobles enlaces conjugados pueden enlazar radicales libres. Bajos niveles de beta-caroteno han sido relacionados con enfermedades cardiovasculares y cáncer, como también en el incremento de riesgo de infarto del miocardio entre fumadores, (28).



**Figura 12.** Moléculas de Carotenos.

## **4.6 TECNICAS CROMATOGRAFICAS**

La cromatografía es un proceso separativo que se basa en repartir sustancias entre dos fases en forma multiplicativa. Una de las fases esta inmóvil (fase estacionaria) y la otra se mueve (fase móvil).

Durante la separación, la fase estacionaria (sólido adsorbente, sorbente) es atravesada por la fase móvil (gas insoluble o líquido inmiscible en la fase estacionaria), en donde actúa como nueva variante un gas supercrítico (un fluido), (36).

La clasificación de los procedimientos cromatográficos se realiza siguiendo distintos principios:

a) Clasificación según la constitución física del soporte:

- Cromatografía en papel (PC).
- Cromatografía en capa fina (CCD).
- Cromatografía en columna (CC).
- Cromatografía gaseosa (GC).

b) Clasificación según la combinación de los distintos tipos de fase:

- Cromatografía líquido-líquido (LLC).
- Cromatografía gas-líquido (GLC).
- Cromatografía gas-sólido (GSC).
- Cromatografía líquido-sólido (LSC).

c) Clasificación de acuerdo con el tipo de separación:

- Cromatografía de reparto, pertenecen aquí la LLC, GLC y algunas variantes específicas de la cromatografía en gel.
- Cromatografía de adsorción, pertenecen aquí las GSC, LSC y algunas variantes específicas de la cromatografía iónica.

### **4.6.1 CROMATOGRAFÍA EN CAPA DELGADA (CCD)**

La cromatografía en capa delgada conocida como CCD es un procedimiento para separar mezclas de sustancias, identificando, caracterizando o determinando semicuantitativamente los componentes individuales. La separación se basa en que las sustancias del analito se repartan de modo diferencial entre ambas fases (estacionaria y móvil).

En la CCD la fase estacionaria (fina capa de sorbente) es atravesada por una fase móvil (eluyente) que transporta los componentes individuales de la mezcla, en donde el recorrido particular de cada sustancia (Valor Rf) depende de la solubilidad y/o de su comportamiento frente a la adsorción.

Las separaciones se realizan por el procedimiento “ascendente”, introduciendo el borde inferior de la placa cromatográfica en el solvente, que será succionado por acción de las fuerzas capilares del recubrimiento de la superficie de la placa, (36).

- **RELACIÓN DE FRENTE (Rf)**

La constante Rf es una manera de expresar la posición de un compuesto sobre una placa en una fracción decimal que mide la retención de un componente. Se define como:

$$R_F = \frac{\text{distancia recorrida desde el origen por el compuesto}}{\text{distancia recorrida desde el origen por el frente del eluyente}} = \frac{X}{Y}$$

La distancia recorrida por el compuesto se mide desde el origen al centro de la mancha.

Para que los Rf sean reproducibles deben ser fijadas una serie de condiciones como el espesor de la placa, fase móvil, fase estacionaria y cantidad de muestra. El máximo valor de Rf que se puede alcanzar es de 1, sin embargo, lo ideal es un Rf entre 0.65 y 0.7, puesto que esto garantiza una buena separación y posible identificación de los componentes del analito, (36).

#### **4.6.2 ADSORBENTES Y REVELADORES**

##### **4.6.2.1 ADSORBENTES**

Al elegir un adsorbente, el tamaño de sus partículas es el principal aspecto a tener en cuenta, pues cuanto más finamente este dividido, mayor será su adhesión al soporte.

- **SÍLICA GEL Y ALUMINA**

Generalmente lleva incorporado un agente aglomerante, yeso (sulfato de calcio semihidratado), para proporcionar firmeza al adsorbente (ver Anexo 1). También han sido incorporados dos indicadores del ultravioleta, juntos o por separados (amarillo y/o verde), en diversos tipos de gel de sílice, (36, 37).

#### 4.6.2.2 REVELADORES

Son los que se utilizan para observar las manchas de un compuesto que a simple vista no se distinguen. Se clasifican en destructivos y no destructivos.

El método destructivo es donde el revelador reacciona con el componente a visualizar para dar una mancha coloreada, sin embargo destruye por completo el analito, a diferencia del método no destructivo, que consiste en la revelación de las manchas pero sin destruir el componente a observar (37).

- **YODO**

El vapor de yodo es un revelador universal que forma complejos coloreados con los componentes orgánicos (con tonos amarillo-marrones), pero las manchas desaparecen con el tiempo siendo así un revelador no destructivo con lo que es conveniente señalar las manchas aparecidas, (38).

- **ACIDO FOSFOMOLIBDICO**

Es un ácido basado en complejos de fósforo y molibdeno. A temperatura ambiente aparece como un sólido amarillo-naranja inodoro, este revelador es utilizado para compuestos terpénicos el cual reacciona con los componentes orgánicos produciendo manchas oscuras, (37).

#### 4.6.3 CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA

La cromatografía en columna consiste en colocar la muestra sobre una fase estacionaria sólida en la cual se adsorberán los componentes, donde los sólidos adsorbentes mas utilizados son óxidos metálicos, óxidos hidratados y sales, siendo los más comunes la gel de sílice y la alúmina, y en casos especiales carbón activo o polvo de poliamida. Luego, se hace pasar una fase móvil sobre el sólido, estableciéndose una especie de competencia por las sustancias de la muestra entre la fase estacionaria y la fase móvil.

La velocidad con que la muestra recorre la columna depende de la polaridad del solvente (fase móvil), pues de este depende en gran parte que algunos compuestos queden retenidos en la fase sólida de manera distribuida.

La relación de adsorbente a muestra suele ser del orden de 1000: 1 para capa fina y 100:1 si es en columna, puesto que el comportamiento de los componentes puede depender de varios factores como:

⇒ Para compuestos de peso molecular comparable, aquellos que tengan una polaridad mayor tienen menor tendencia a moverse del punto de partida.

⇒ Para compuestos de polaridad comparable, quedan más retenidos aquellos que posean el peso molecular más grande, (39, 40).

#### 4.6.4 SEPARACIÓN EN FASE SÓLIDA (SFS)

La extracción en fase sólida es una técnica de separación que se basa en los principios de la cromatografía líquida.

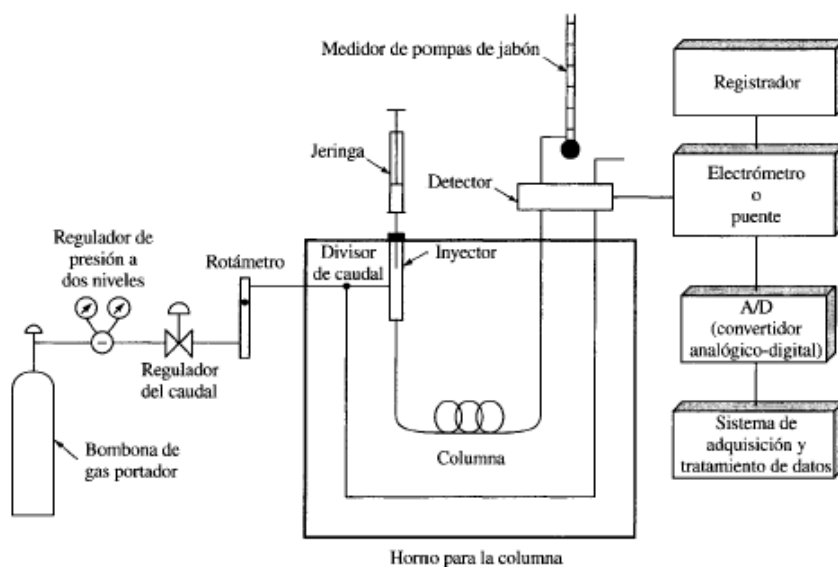
En cualquier sistema de extracción en fase sólida se debe tener en cuenta la muestra problema que contiene los analitos, la fase estacionaria o soporte sólido y los solventes de acondicionamiento, lavado y elución.

Los componentes de la muestra se separan por migración diferencial desde la fase estacionaria hasta los solventes de lavado y elución, dependiendo de las propiedades físicas o químicas de cada compuesto.

La mayoría de las fases estacionarias utilizadas para extracciones en fase sólida son de sílica gel o modificaciones de esta con tamaños de partícula en promedio de 40  $\mu\text{m}$  y tamaños de poro por lo general de 60 Å, exceptuando aquellas usadas en las separaciones por tamaño molecular, (39).

#### 4.6.5 CROMATOGRAFÍA DE GASES (CG)

Esta cromatografía permite la separación de compuestos orgánicos e inorgánicos térmicamente estables y volátiles. En esta técnica el gas portador es almacenado en una bala de alta presión, que proporciona una presión fija al controlador del caudal de gas. La muestra se volatiliza y se introduce en el inyector (normalmente calentado), donde es diluida con el gas portador inerte que pasa por toda la columna hasta llegar al detector, (figura 13).



**Figura 13.** Representación esquemática de un cromatógrafo de gases, (39).



Existen dos tipos de cromatografía de gases: cromatografía gas-sólido y cromatografía gas-líquido. En la cromatografía gas-sólido se produce la retención de los analitos en una fase estacionaria sólida como consecuencia de la adsorción física; y la cromatografía gas-líquido se basa en la distribución del analito entre una fase móvil gaseosa y una fase líquida inmovilizada sobre la superficie de un sólido inerte, (39, 41).

#### **4.6.5.1 DETECTORES**

Los detectores mas utilizados en la cromatografía de gases son:

- Detector de ionización de llama (FID)
- Detector de conductividad térmica (TCD)
- Detector de quimioluminiscencia de azufre (SCD)
- Detector de captura de electrones (ECD)
- Detector de emisión atómica (AED)
- Detectores termoiónicos (TID)
- Espectrómetro de masa

##### **• DETECTOR DE IONIZACIÓN DE LLAMA (FID)**

El FID como tal es un quemador, donde el efluente de la columna se mezcla con hidrógeno y aire para luego encenderse eléctricamente. La mayoría de los compuestos orgánicos, cuando se pirolizan a la temperatura de una llama de hidrógeno/aire, producen iones y electrones que pueden conducir la electricidad a través de la llama.

La ionización en la llama de los compuestos que contienen carbono no es un proceso bien establecido, aunque se observa que el número de iones que se producen es relativamente proporcional al número de átomos de carbonos reducidos en la llama. El FID responde al número de átomos de carbono que entra en el detector por unidad de tiempo, por ello, es más un detector sensible a la masa que un sistema sensible a la concentración.

Grupos funcionales tales como carbonilo, alcohol, halógeno y amina, originan en la llama pocos iones o prácticamente ninguno. Además, el detector es insensible a los gases no combustibles como  $H_2O$ ,  $CO_2$ ,  $SO_2$  Y  $NO_x$ .

Estas propiedades hacen del FID uno de los detectores generales más utilizado para el análisis de la mayoría de compuestos orgánicos, incluyendo aquellos que están contaminados con agua, óxidos de nitrógeno y azufre. La insensibilidad del

FID hacia el agua le hace particularmente útil para la detección de contaminantes en muestras naturales de agua, además posee una elevada sensibilidad ( $\sim 10^{-13}$  g/s), un gran intervalo de respuesta lineal ( $\sim 10^7$ ), y un bajo ruido. Sin embargo, una desventaja del FID es que se trata de un detector destructivo de la muestra, (40).

- **ESPECTROMETRO DE MASAS**

Mediante el análisis por espectrometría de masas es posible obtener conocimiento de la masa molecular del compuesto analizado e información estructural del mismo. Para ello es necesario ionizar las moléculas y obtener los iones formados en fase gaseosa. Este proceso tiene lugar en la fuente de ionización y actualmente, existen diferentes técnicas que permiten llevarlo a cabo como Impacto Electrónico (EI), Bombardeo con átomos rápidos (FAB), Ionización Química a Presión Atmosférica (APCI), Desorción/Ionización por Láser Asistida por Matriz (MALDI) o Electrospray (ESI).

Los iones generados son acelerados hacia un analizador y separados en función de su relación masa/carga ( $m/z$ ) mediante la aplicación de campos eléctricos, magnéticos o simplemente determinando el tiempo de llegada a un detector. Los iones que llegan al detector producen una señal eléctrica que es procesada, ampliada y enviada a un ordenador. El registro obtenido se denomina espectro de masas y representa la abundancia iónica obtenida en función de la relación masa/carga de los iones detectados.

Es posible obtener espectros de masa a partir de cantidades relativamente pequeñas, lo cual posibilita el acoplamiento de un espectrómetro de masa a un cromatógrafo de gases, una de las combinaciones de aparatos más eficiente para la identificación y el estudio de sustancias difíciles de aislar en cantidad apreciable.

El espectrómetro de masas es un detector universal para cromatografía de gases, ya que cualquier compuesto que pueda pasar a través de un cromatógrafo de gases se convierte en iones en un espectrómetro de masas, (39).

#### **4.6.6 CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS (GC/MS)**

La cromatografía de gases/espectrometría de gases (GC/MS) es una técnica para el análisis de mezclas orgánicas y bioquímicas complejas. Se procesan los espectros de los compuestos que salen de la columna cromatográfica, que son almacenados en un ordenador.

La espectrometría de masas se puede acoplar a la cromatografía de líquidos (LC/MS) para el análisis de muestras que tienen componentes no volátiles. Sin embargo el mayor problema es que la muestra en la columna cromatográfica está muy diluida por el gas o el líquido portador que la atraviesa. Por tanto se debe eliminar el eluyente antes de introducirlo en el espectrómetro de masas, (39).

#### **4.6.7 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA. (HPLC)**

En la cromatografía líquida (CL) la fase móvil esta compuesta por un líquido y la fase estacionaria por dos tipos básicos de rellenos (pelicular y de partícula porosa).

El poder de la cromatografía líquida reside en la combinación de un alto intervalo de posibles propiedades de la fase móvil, junto con la elección de numerosos tipos de fases estacionarias, significativamente diferentes, así como una amplia variedad de detectores. Los diferentes tipos de cromatografía líquida también se clasifican de acuerdo a la interacción que se produce entre la fase estacionaria y el soluto. Según esta clasificación se denominan cromatografías de fase normal, de fase reversa, de intercambio iónico y de filtración gel. Algunas fases estacionarias se diseñan para que interaccionen con grupos químicos específicos. La cromatografía en la que la fase estacionaria presenta puntos activos para los grupos específicos se llama cromatografía de afinidad. La fase estacionaria también puede estar hecha con grupos quirales unidos a ella.

Es importante entender que la separación por CL no se produce por un único tipo de interacción entre los analitos y la fase estacionaria. Siempre hay otras interacciones además de la mencionada, pero la que predomine indicará el tipo, (39).

- **CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA EN FASE NORMAL**

Presenta una fase sólida es más polar que la fase móvil, debido a que los enlaces de la fase estacionaria muestran momentos dipolares mayores que los enlaces de las moléculas del disolvente.

Las fases estacionarias son normalmente polímeros inorgánicos (sílice o alúmina) con un gran número de poros de tamaño molecular de pocos nm a decenas de nm, generando un área superficial muy grande.

La polaridad del disolvente es el principal factor que determina los volúmenes de elución. Con disolventes más polares los solutos se mueven más rápidamente y eluyen en menor tiempo, (39).

- **CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA EN FASE REVERSA**

En esta cromatografía la fase estacionaria es de menor polaridad que la fase móvil. Se utilizan fundamentalmente dos tipos de fases, siendo la más común formada por

grupos no polares unidos a la sílice, ( $-\text{CH}_3$ ,  $-\text{C}_8\text{H}_{17}$ , y  $-\text{C}_{18}\text{H}_{37}$ ). De ellos, la cadena de 18 carbonos (grip octadecilo) es la más conocida.

El segundo tipo de fase estacionaria está compuesta de partículas esféricas de polímero orgánico (resina de poliestireno y divinilbenceno), las cuales generan enlaces cruzados con un reforzamiento físico, resistiendo así las deformaciones bajo presión.

En las separaciones de fase reversa los picos tienden a ser agudos, simétricos y el equilibrio en las reacciones adsorción/desorción tiende a ser rápido, (39).

#### **4.6.8 DETECTORES**

Existen dos tipos básicos de detectores para cromatografía líquida, los que se basan en la medida de una propiedad de la disolución, respondiendo a una propiedad del efluente, tal como el índice de refracción, la constante dieléctrica, o la densidad, que se modifica por la presencia de los analitos, por el contrario, los otros detectores que se basan en una propiedad del soluto como la absorbancia en el UV, fluorescencia o corriente límite, que no son inherentes a la fase móvil, (39).

- **DETECTOR ULTRAVIOLETA**

Es un dispositivo de doble haz, en donde uno de los haces pasa por la cubeta de flujo y el otro a través de un filtro que reduce la intensidad. Se utilizan detectores fotoeléctricos contrastados para comparar las intensidades de los dos haces.

Las fuentes de deuterio o filamento de wolframio con filtros de interferencia, también proporcionan una forma sencilla de detectar las especies absorbentes que eluyen de una columna.

Un detector de longitud de onda variable es un espectrofotómetro UV-vis con paso de banda relativamente amplio, acoplado a un sistema cromatográfico.

Un detector de barrido de longitud de onda utiliza dispositivos de diodos de estado sólido, los cuales trabajan en paralelo, destacando simultáneamente todas las longitudes de onda, (39).

- **DETECTOR DE FLUORESCENCIA**

Muestra la fluorescencia por medio de un detector fotoeléctrico colocado perpendicularmente respecto al haz de excitación, en algunos casos se utilizan fuentes de excitación de mercurio y uno o más filtros para aislar la radiación emitida.

El número de especies fluorescentes puede aumentarse mediante tratamientos previos de la muestra con reactivos que originen derivados fluorescentes, este método es utilizado para la detección de aminoácidos en los hidrolizados de proteínas.

Los instrumentos más sofisticados consisten en una fuente de radiación de xenón y emplean un monocromador de red para aislar la radiación fluorescente, (39).

## 5- METODOLOGÍA

### 5.1 PRETRATAMIENTO DE LA MUESTRA

Se emplearon semillas de la *Luffa Cylindrica* obtenidas del proceso de beneficio realizado por la empresa ESTROCOL. Dicha empresa proporciono estas semillas, las cuales fueron sometidas a una limpieza con etanol y a un proceso de molido por medio de un molino de aspas.

Posteriormente las semillas molidas y enteras restantes se almacenaron en bolsas plásticas herméticas, a una temperatura de 4 °C en refrigerador, (figura 14).



Figura 14. Semillas *Luffa Cylindrica*.

### 5.2 EXTRACCIÓN DEL ACEITE

Se realizó la extracción del aceite por el método soxhlet, utilizando como solvente n-hexano en una relación muestra volumen de 1:5 durante un tiempo de dos horas, concentrando el extracto por retroevaporación; según estudios previos, (7). El aceite obtenido fue almacenado en un recipiente ámbar a temperatura ambiente.

### 5.3 OBTENCIÓN DE LA MATERIA INSAPONIFICABLE

La saponificación del aceite de las semillas de la *Luffa Cylindrica* y la cuantificación de la materia insaponificable obtenida se realizó por triplicado según Norma Icontec NTC 235-2, (42).

### 5.4 ANÁLISIS DE FITOESTEROLES

La separación de la fracción de fitoesteroles de la materia insaponificable se hizo por separación en fase sólida, empleando columnas elaboradas en el laboratorio (pipetas Pasteur), utilizando como adsorbente Sílica gel 60 con un tamaño de partícula de 70-230 mesh, en una relación Sílica-muestra de 1:20 (0.5g:0.025g)

con base en estudios previos, (43). Se acondicionó la columna con 4 mL de Hexano, luego se llevo a sequedad con aire y posteriormente se aplico la muestra (figura 15).



**Figura 15.** Microcolumna de fraccionamiento.

Se ensayaron dos sistemas de elución, S1: Hexano:Diclorometano y S2: Hexano: Acetato de Etilo (tabla 4). Las fracciones obtenidas se evaluaron por cromatografía de capa delgada.

Fracción		Sistema 1
	Relación	Volumen (mL)
F1	Hex: Ac. Etilo 9:1	1.5
F2	Acetato de Etilo	2
	Volumen total de elución	=3.5 mL
		Sistema 2
	Relación	Volumen (mL)
F3	Hex: Dicloromet. 6:4	5
F4	Diclorometano	2
	Volumen total de elución	=7 mL

**Tabla 4.** Sistemas de separación en fase sólida.

## **5.5 CARACTERIZACIÓN PRELIMINAR DE LAS FRACCIONES POR CROMATOGRAFÍA DE CAPA DELGADA**

Las fracciones obtenidas de la separación en fase sólida se evaluaron por cromatografía en capa delgada, empleando placas de vidrio con Sílica gel 60 como fase estacionaria de 7.8 x 2.5 cm preparadas en el laboratorio (ver anexo 2). La siembra se hizo por duplicado en las placas activadas y se empleó como fase móvil Hexano: Éter etílico: Ácido Acético (8: 2: 0.1), utilizando previamente por otros autores para el estudio de esteroides, (43).

Cada fracción se analizó por triplicado; utilizando como reveladores Vapores de Yodo (A) y Ácido fosfomolibdico (B) preparado al 10% en etanol absoluto, (43).

## **5.6 CARACTERIZACIÓN DE LA FRACCIÓN DE FITOESTEROLES POR CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A UN ESPECTROFOTÓMETRO DE MASAS (CG-EM)**

Se analizó la fracción de fitoesteroides (F2) obtenida de la separación en fase sólida (Tabla 5) en un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas (GCMS-QP2010 Shimadzu), (44).

**Las condiciones cromatográficas utilizadas fueron:**

**Columna capilar**      Rtx-5sil MS Crossbond  
Longitud: 30 m  
Diámetro: 0.25 mm  
Fase: 5% difenil/95% dimetilpolisiloxano

**Programación de temperatura**

T<sub>1</sub>: 150°C/2 minutos  
R<sub>1</sub>: 8°C/minuto  
T<sub>2</sub>: 320°C/6 minutos  
Tiempo total de corrida: 30 minutos

**inyector**              Automático: AOC-20i Autoinjector Shimadzu  
Temperatura: 310 °C



Volumen de inyección: 1.0  $\mu$ L

Modo de inyección: Split

**Gas**

Gas transportador: He

Flujo total: 6.4 mL/minuto

Presión: 101.4 kPa

**Detector**

Tipo: Espectrómetro de masas

MS-UP2010 system

Temperatura del detector: 260°C

Ionización por impacto electrónico a 70 eV

## 5.7 ANÁLISIS DE VITAMINA E

Se realizó el análisis de Vitamina E al aceite de las semilla de la *Luffa Cylindrica* por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), empleando un detector de fluorescencia (FL). Se evaluó la presencia de tocotrienoles ( $\alpha$ -tocotrienol,  $\beta$ -tocotrienol,  $\delta$ -tocotrienol y  $\gamma$ -tocotrienol) y tocoferoles ( $\alpha$ -tocoferol,  $\beta$ -tocoferol,  $\delta$ -tocoferol,  $\gamma$ -tocoferol). Se empleó una columna Merck, Chromolith RP-18e (4.6 x 100 mm). La determinación se basó en la metodología descrita por Pascal *et al.*, **2004** con modificaciones hechas en el Laboratorio de Caracterización de Aceites de CENIPALMA. Para la cuantificación de tocoferoles y tocotrienoles se empleó el método de estándar externo, utilizando patrones certificados de CALBIOCHEM (Tocotrienol Set Cat. No. 613432), CALBIOCHEM (Tocopherol Set Cat. No. 613424). Este análisis se realizó en el centro de investigación CENIPALMA.

## 5.8 ANÁLISIS DE $\beta$ -CAROTENO

El análisis de los isómeros ( $\alpha$ - y  $\beta$ -caroteno) al aceite de las semillas de la *Luffa Cylindrica* se realizó por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), empleando el detector de Ultravioleta-Visible (UV-Vis) y una columna Merck, Chromolith RP-18e (4.6 x 100 mL). La metodología se desarrolló según lo describe Rodríguez Delia, **1999**. La cuantificación se realizó por el método de estándar externo y como patrón de calibración se empleó  $\beta$ -caroteno 97%, Sigma-Aldrich C-4582.

## 6- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 DESCRIPCIÓN DEL ACEITE

El aceite de las semillas de la *Luffa Cylindrica* presentó una coloración verde oscura (figura 16) y un contenido de aceite del 17.8% (tabla 5); este contenido comparado con los obtenidos en extracciones de estudios anteriores (15.7% y 15.03%) fue mayor, posiblemente por el tipo de molienda empleada, puesto que el molino de aspas genera un menor tamaño de partícula que el de frotación por discos, obteniéndose un polvo mas homogéneo y fino pues mejoró la interacción muestra: solvente. Comparativamente con el contenido de aceite de otras semillas se asemeja al de semillas de uva (13% - 18.4%) y de soya (~ 20%). (7, 45, 46).

Ensayo	Masa semillas (g)	Masa aceite (g)	% aceite obtenido
1	171.407	30.4590	17.77
2	70.3202	12.5451	17.84
3	78.5788	13.9792	17.79
Rango superior			17.84
Rango inferior			17.77
Promedio			17.80
Desviación estándar			0.0360

**Tabla 5.** Determinación de la cantidad de aceite contenido en las semillas de la *Luffa Cylindrica*.

Con los datos de las tres extracciones realizadas para hallar el contenido de aceite en las semillas de la *Luffa Cylindrica* (17.8%), y de acuerdo con la desviación estándar obtenida (0.0360), la técnica es confiable y los datos reproducibles.



**Figura 16.** Aceite de las semillas de la *Luffa Cylindrica*.

## 6.2 DESCRIPCIÓN DE LA MATERIA INSAPONIFICABLE

La materia insaponificable presenta una coloración amarilla verdosa y aspecto fluido a temperatura ambiente (figura 17), además su olor se puede relacionar al del aceite obtenido de las semillas de la *Luffa Cylindrica*.



Figura 17. Materia Insaponificable.

## 6.3 CUANTIFICACIÓN DE LA MATERIA INSAPONIFICABLE

Los resultados de la cuantificación se observan en la tabla 6, como se aprecia, el contenido de materia insaponificable en el aceite de las semillas de la *Luffa Cylindrica* es de 38.6%. Al comparar este contenido de materia insaponificable con los reportados para otros aceites de origen vegetal como el de girasol (0.58%), palma (0.33%), castor (0.35 %) y almendras (1-3 %) (45, 46), se puede observar que esta muy por encima de estos, indicando una marcada diferencia que debe ser tomada en cuenta para posteriores estudios.

Ensayo	Masa aceite (g)	Masa materia insaponificable (g)	% materia insaponificable
1	5.0019	1.9272	38.53
2	5.0210	1.9416	38.67
3	5.1000	1.9691	38.61
Rango superior		1.9691	38.67
Rango inferior		1.9272	38.53
Promedio		1.9460	38.60
Desviación estándar		0.0213	0.0701

Tabla 6. Determinación de la materia insaponificable.

En la tabla 6 se encuentran los datos de las tres cuantificaciones realizadas de la materia insaponificable, donde se aprecia que su contenido de 38.6% en el aceite de las semillas de la *Luffa Cylindrica* y de acuerdo con la desviación estándar obtenida (0.0701) es confiable y reproducible.

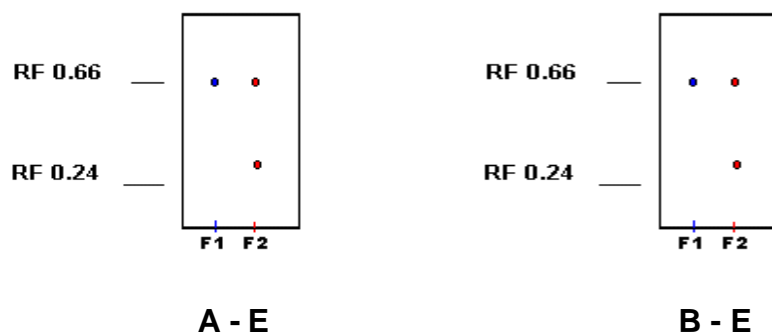
#### 6.4 CARACTERIZACIÓN DE LA FRACCIÓN DE FITOESTEROLES OBTENIDA POR SEPARACIÓN EN FASE SÓLIDA

Para evaluar el resultado del fraccionamiento de la materia insaponificable por separación en fase sólida se utilizó cromatografía en capa delgada.

##### 6.4.1 CARACTERIZACIÓN PRELIMINAR POR CROMATOGRFÍA EN CAPA DELGADA

###### 6.4.1.1 SISTEMA 1 (HEXANO: ACETATO DE ETILO)

Los resultados por cromatografía en capa delgada de cada una de las fracciones obtenidas por separación en fase sólida se pueden observar en la figura 18. Las cromatoplas se realizaron por triplicado (ver originales en anexo 3).



**Figura 18.** Separación por CCD de fracciones obtenidas por separación en fase sólida S1, donde E es el eluyente con que se eluyeron las placas (Hexano: Éter etílico: Ácido Acético 8: 2: 0.1), A es el revelador de Vapores de Yodo y B es el revelador Ácido Fosfomolibdico.

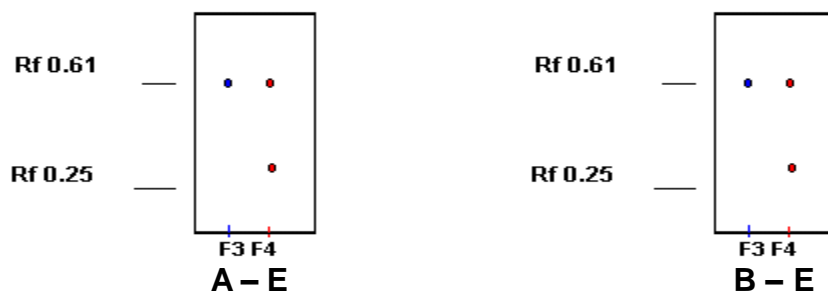
Como se observa en la figura 18 en la cromatografía de capa delgada de la fracción insaponificable revelada con vapores de yodo (revelador universal), se pueden observar tres manchas de Rf definidos. En la fracción 1 (F1) se observó una mancha de Rf 0.66 y en la fracción 2 (F2) se aprecian dos manchas, una de Rf 0.24 y la otra de Rf 0.66. De acuerdo con el sistema de separación empleado por otros autores, reportan que los compuestos esteróicos revelan en un rango de Rf (0.22 – 0.28), confirmando en la fracción 2 la presencia de compuestos

esterólicos, (43). Sin embargo, las manchas comunes en ambas fracciones (F1 y F2) indican que no fue posible separar completamente los esteroides de los demás tipos de compuestos.

En la figura 18 también se puede apreciar que la fracción de materia insaponificable en la cromatografía de capa delgada revelada con ácido fosfomolibdico, se observan los mismos resultados que los obtenidos en la cromatoplaqueta anterior revelada con vapores de yodo. Esto indica que en la fracción de materia insaponificable hay presencia de compuestos insaturados evidenciados por los vapores de yodo y de compuestos esteroidales evidenciados por el ácido fosfomolibdico. Sin embargo la fracción 2 fue la de interés para continuar con los análisis posteriores para la identificación de fitoesteroides (38).

#### 6.4.1.2 SISTEMA 2 (HEXANO-DICLOROMETANO)

Este sistema se empleo con el fin de mejorar la separación obtenida con el sistema 1. Sin embargo como se aprecia en la figura 19, la mejor separación se dio con 5 mL de Hexano-Diclorometano 6: 4 (F3) y con 2 mL de Diclorometano (F4), obteniéndose los mismos resultados que en el sistema 1. Cada ensayo se realizó por triplicado (ver originales anexo 4).



**Figura 19.** Fracciones obtenidas por separación en fase sólida S2, donde E es el eluyente con que se eluyeron las placas (Hexano: Éter etílico: Acido Acético 8: 2: 0.1), A es el revelador de Vapores de Yodo y B es el revelador Ácido Fosfomolibdico.

El sistema 2 no aportó mayor separación y no mejoro los resultados del sistema 1, puesto que al revelar con vapores de yodo se observaron 3 manchas, una en F3 con Rf 0.61 y las otras dos en F4, una mancha con Rf 0.25 y la otra con Rf 0.61, de igual manera para el acido fosfomolibdico, logrando evidenciar la presencia del mismo tipo de compuestos visualizado en las cromatoplaquetas del sistema 1, por esta razón se sigue con el sistema 1, ya que en el análisis por CG-EM el Acetato de etilo tiene menor interferencia que el Diclorometano.

#### 6.4.2 CARACTERIZACIÓN DE LA FRACCIÓN DE FITOESTEROLES POR CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS

De acuerdo con el análisis cromatográfico se separaron 22 compuestos de los cuales 5 se estimaron como fitoesteroles (tabla 7) y (anexo 5). La identificación preliminar de las estructuras se realizó por comparación de sus espectros de masa con los reportados por la biblioteca del equipo de WILEY ACCESS PAC 7 ED y por el análisis de sus principales fragmentos. Sin embargo es de anotar que no fue posible obtener espectros con porcentajes mayores al 90% de similitud, lo que indica una alta contaminación de la fracción de fitoesteroles por otro tipo de compuestos, y que debido a no contar con un estándar tampoco se tenía el criterio del tiempo de retención que habría contribuido en la identificación.

Pico	Tiempo de retención	Nombre	Área	% Área
1	17.531	Phytol	41615086	6.70
2	21.007	2,3-Dimethylbenzofuran	2798529	0.45
3	21.122	Pentamethylbenzenesulphonamide	3002105	0.48
4	21.243	Pentamethylbenzenesulphonamide	1765391	0.28
5	21.368	Pregna-3,5-dien-20-one	4335708	0.70
6	21.448	5.beta.-16-pregnene-3.beta.-ol-20-one	6002306	0.97
7	21.593	Pregn-5-en-20-one,3-(acetyloxy)-,(3.beta)	2038744	0.33
8	23.262	2,6,10,14,18,22-Tetracosahexaene	3802336	0.61
9	25.266	Anthraquinone	19338608	3.11
10	27.956	Lup-20(29)-en-3-ol	8436114	1.36
11	28.157	Lanosterol	7647728	1.23
12	28.276	Ergost-5,8(14)-dien-3-ol	10238291	1.65
13	28.532	Ergosta-8,24(28)-dien-3-ol,4,14-dimethyl	7843989	1.26
14	28.780	Ergosta-7,22-dien-3-ol,(3.beta.,5.alpha)	86755724	15.06
15	28.825	Cyclohexane,1,5-diethyl-2,3-dimethyl	50402829	10.18
16	29.190	(-)-Globulol	13875411	2.23
17	29.355	7,22-Ergostadienone	37119232	5.98
18	29.486	Lanosterol	68098198	10.96
19	29.613	Norolean-12-ene	13201147	2.13
20	30.107	3,9b-Epoxy-3,3a,6,6,9a.alpha-pentamethyl	27084593	4.36
21	30.296	Lanosterol	73256390	10.80
22	30.648	Pregnan-17,21-diol-9,11-epoxy-3,20-dione	6642341	1.07

**Tabla 7.** Análisis composicional por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas de la fracción en Acetato de Etilo (F2) de la materia insaponificable del aceite de las semillas de la *Luffa Cylindrica*.

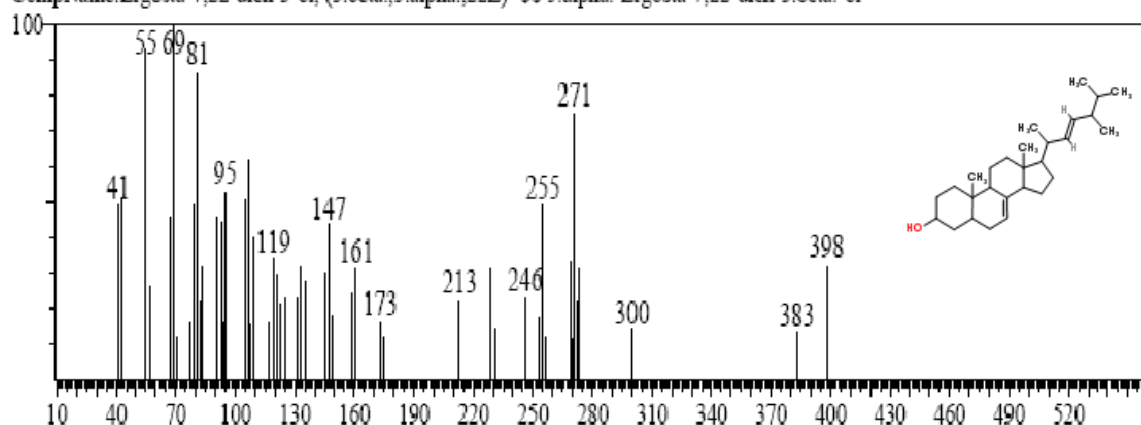
En cuanto a los compuestos mayoritarios presentes en el grupo de fitoesteroides se identificaron tentativamente el de tr 28.780, con un porcentaje de área de 15.06% (tabla 7), propuesto por la biblioteca como “Ergosta-7,22-dien-3-ol,(3.β.,5.α)” con un porcentaje de similitud de 79%. En su espectro se encontró el fragmento de m/z 398 (peso molecular) y como pico base el m/z 69, seguido por los fragmentos m/z 41, m/z 55, m/z 81 y m/z 95 que corresponden a las estructuras propuestas en la figura 20.

A.

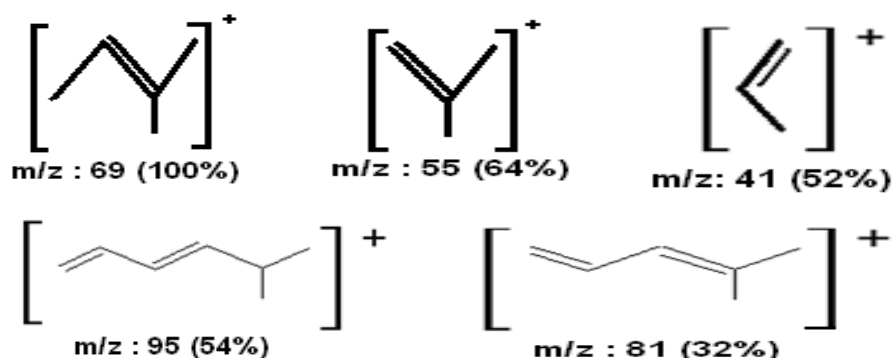
Hit#:1 Entry:378845 Library:WILEY7N2.LIB

SI:79 Formula:C28H46O CAS:2465-11-4 MolWeight:398 RetIndex:0

CompName:Ergosta-7,22-dien-3-ol, (3.β.,5.α.,22E)- \$\$\$ 5.α.-Ergosta-7,22-dien-3.β.-ol



B.



**Figura 20.** A. Espectro de masas del compuesto Ergosta-7,22-dien-3-ol,(3.β.,5.α) con tr 28.780 min.

B. Principales fragmentos del espectro de masas del Ergosta-7,22-dien-3-ol,(3.β.,5.α).

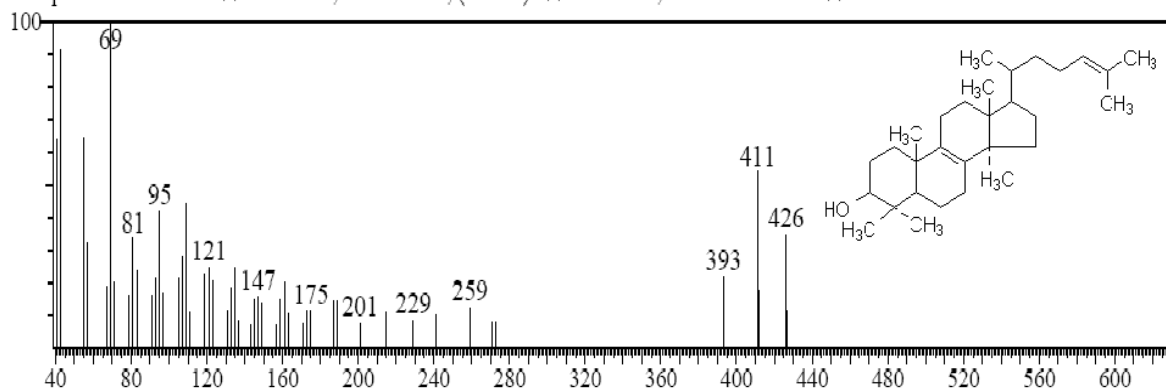
El segundo en importancia corresponde al de tr 29.486, con un porcentaje de área de 10.96% (tabla 7), cuya estructura propuesta por la biblioteca fue “Lanosterol” con un porcentaje de similitud de 85%. Según su espectro se encontró el fragmento m/z 426 correspondiente al peso molecular y como pico base el m/z 69 correspondiente al fragmento representado en la figura 21. Igual que en el compuesto anterior se pudo corroborar la presencia de los fragmentos característicos m/z 55, m/z 81 y m/z 95 de fitoesteroides, sin embargo no se tiene información suficiente para su plena identificación.

A.

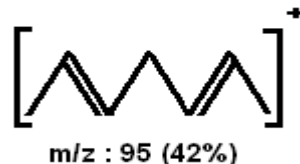
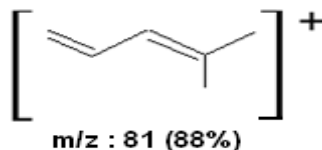
Hit#:1 Entry:394311 Library:WILEY7N2.LIB

SI:85 Formula:C<sub>30</sub>H<sub>50</sub>O CAS:79-63-0 MolWeight:426 RefIndex:0

CompName:Lanosterol \$\$ Lanosta-8,24-dien-3-ol, (3.beta.)- \$\$ Lanosta-8,24-dien-3.beta.-ol \$\$ Botalan base 138



B.



**Figura 21.** A. Espectro de masas del compuesto Lanosterol con tr 30.296 min.

B. Principales fragmentos del espectro de masas del Lanosterol.



En menor porcentaje se encontraron posibles derivados del Ergosterol como el 7,22-Ergostadienona con un porcentaje de área de 5.98% y un porcentaje de similitud del 77%, el Ergost-5,8(14)-dien-3-ol con un porcentaje área de 1.65% y un porcentaje de similitud de 85% y el Ergosta-8,24(28)-dien-3-ol,4,14-dimethyl con un porcentaje de área de 1.26% y un porcentaje de similitud de 84%.

Según el análisis de los diferentes espectros de masas fue posible corroborar los fragmentos que confirman los picos más representativos del espectro (figura 20 y 21). Sin embargo no es posible su identificación por la presencia de muchos interferentes que se evidencian en el porcentaje de similitud de los espectros que no superan el 90%. Se requiere que para posteriores estudios obtener una fracción de fitoesteroles más limpia con el fin de obtener mejores espectros, así como de usar un estándar de estos compuestos para identificarlos también por comparación con el tiempo de retención.

Los posibles esteroides encontrados dentro de la materia insaponificable como el Lanosterol y derivados del Ergosterol tienen diferentes beneficios. El Lanosterol es un compuesto que no posee actividad alergénica, (47) y el Ergosterol es una sustancia que, bajo la acción de los rayos ultravioletas del sol sobre la piel, da lugar a la vitamina D. Esta vitamina interviene en el metabolismo del calcio y del fósforo, estimula la formación del hueso y previene el raquitismo en los niños, (48), además estudios clínicos han mostrado que estos esteroides cuando son consumidos ofrecen protección contra las enfermedades cardiovasculares, (20) y reducen significativamente la concentración del colesterol de baja densidad (LDL), (10, 21, 49, 50) el cual es responsable particularmente de las enfermedades coronarias, (51, 52).

## **6.5 ANÁLISIS DE VITAMINA E**

En el cromatograma se pudo observar un pico (figura 22), que corresponde al  $\alpha$ -Tocoferol con un tiempo de retención de 4.09 min, sin embargo no se observaron tocotrienoles.

El valor obtenido para el aceite de las semillas de la *Luffa Cylindrica* en cuanto al contenido de vitamina E fue de 621 ppm (tabla 8), valor bastante significativo en comparación con cereales como el trigo (7.29 ppm) que es considerado para una alimentación diaria, (53) con relación a aceites vegetales, como el aceite de oliva (271 ppm), (54), aceite de almendras (262 ppm) y extracto de aguacate para usos cosméticos (32 ppm), (55, 56) y alimentos de origen animal como el pescado (Tilapia aprox. 200 ppm), (57), el valor es superior, lo que hace que este aceite sea de gran interés para un potencial uso cosmético, donde se podría emplear para la elaboración de diversos productos como cremas nutritivas, productos

exfoliantes, tratamientos para el cabello, cremas hidratantes faciales y corporales con filtro protector contra los rayos UV, además de ser un posible aditivo para la complementación de otros aceites y productos, (3, 4, 5, 58).

Se ha considerado que la adición directa de vitamina E sobre la piel impide la penetración de la radiación ultravioleta, es decir, actúa como un filtro solar, por tanto se puede sugerir según estudios clínicos la aplicación directa del aceite de las semillas de la *Luffa Cylindrica*, (4); donde además su posible contenido de Lanosterol es favorable, puesto que una de sus principales características es que no posee actividad alergénica, (47, 59, 60, 61, 62).

Con relación a estudios anteriores se encontró que el aceite de las semillas de la *Luffa Cylindrica*, presenta una alta estabilidad oxidativa, con un índice de peróxidos de 0 y un índice de acidez de 0.319% de Ac Oleico y 0.227% de Ac Laurico, donde el alto contenido de  $\alpha$ -tocoferol hallado en este aceite (621 ppm), actúa sobre esta misma estabilidad por su acción antioxidante, (7).

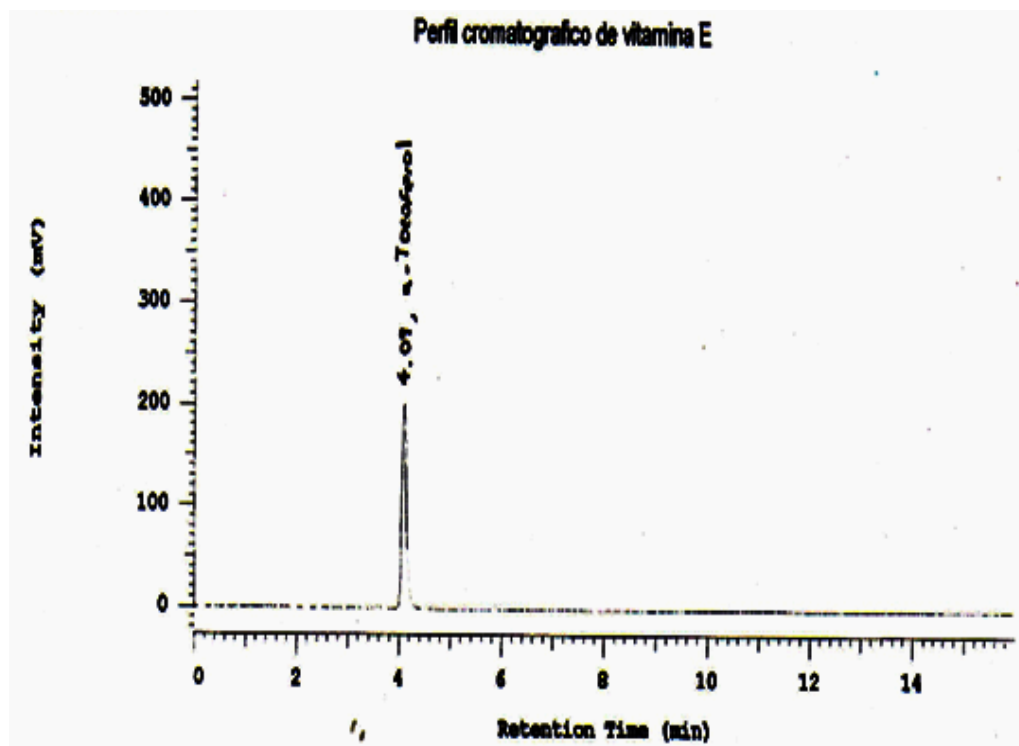


Figura 22. Perfil cromatográfico de Vitamina E en el aceite de las semillas de la *Luffa Cylindrica*.

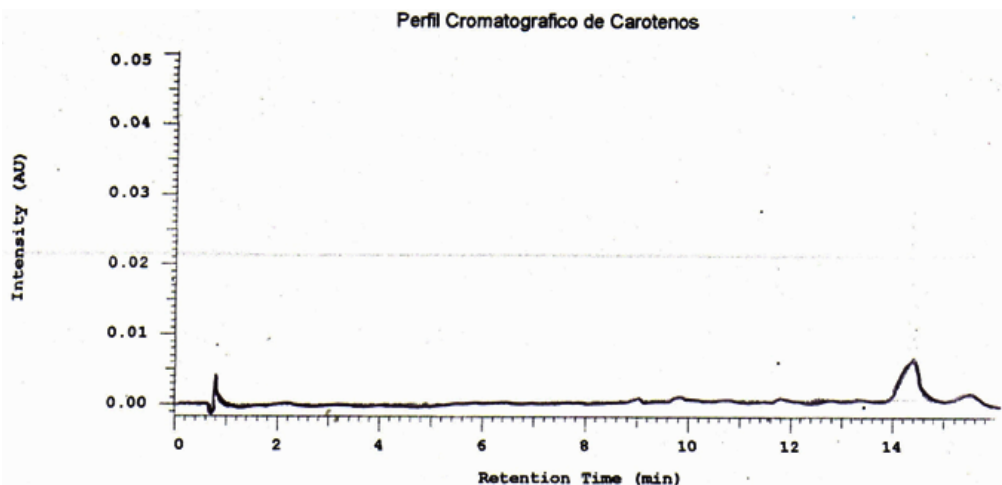
Nombre	Aceite UTP		
	Réplica 1	Réplica 2	Promedio
<b>Vitamina E, mg/Kg (ppm)</b>			
δ- Tocotrienol	n.d	n.d	n.d
β +γ -Tocotrienol	n.d	n.d	n.d
α- Tocotrienol	n.d	n.d	n.d
δ- Tocoferol	n.d	n.d	n.d
β +γ - Tocoferol	n.d	n.d	n.d
α - Tocoferol	630,626	610,387	621
<b>Total Vitamina E</b>	<b>630,626</b>	<b>610,387</b>	<b>621</b>

**Tabla 8.** Resultados de la cuantificación de Vitamina E en el aceite de las semillas de la *Luffa Cylindrica*.

Según los datos reportados de la cuantificación de  $\alpha$ -tocoferol en el aceite de las semillas de la *Luffa Cylindrica*, el resultado es el promedio de dos valores que presentan una diferencia aproximada de 3.2%, que puede deberse a la variabilidad propia del método, pues según información suministrada por el analista, este se encuentra limitado por la baja estabilidad de los estándares utilizados.

## 6.6 ANÁLISIS DE $\beta$ -CAROTENO

En el cromatograma se observó un pico (figura 23) que corresponde al  $\beta$ -Caroteno, con un tiempo de retención de 14.27 min.



**Figura 23.** Perfil cromatográfico de Carotenos en el aceite de las semillas de la *Luffa Cylindrica*.

El valor obtenido para el aceite de las semillas de la *Luffa Cylindrica* en cuanto al contenido de  $\beta$ -Caroteno fue de 58 ppm (tabla 9), valor muy bajo en comparación el aceite de girasol (500 ppm), (63). Además no está presente el  $\alpha$  - Caroteno.

Nombre	Aceite UTP		
	Réplica 1	Réplica 2	Promedio
<b>Carotenos, mg/Kg (ppm)</b>			
$\alpha$ - Caroteno	n.d	n.d	n.d
$\beta$ - Caroteno	56.629	58.543	58
<b>Total Carotenos</b>	56.629	58.543	<b>58</b>

**Tabla 9.** Resultados de la cuantificación de Carotenos en el aceite de las semillas de la *Luffa Cylindrica*.

En la tabla 8 se reportan los datos de la cuantificación de  $\beta$ -Caroteno en el aceite de las semillas de la *Luffa Cylindrica* (58ppm), resultado promedio de dos valores que presentan una diferencia de aproximadamente 3.2%, valor poco significativo que permite una confiabilidad y reproducibilidad del método y el resultado como tal.

## CONCLUSIONES

- El contenido de aceite en las semillas de la *Luffa Cylindrica* cultivadas en Risaralda fue de 17.8 %.
- El contenido de materia insaponificable en el aceite de las semillas de la *Luffa Cylindrica* fue de 38.60%.
- El mejor fraccionamiento para la obtención de compuestos esterólicos por separación en fase solida con Sílice gel 60 se logró eluyendo con 1.5 mL de Hexano: Acetato de Etilo 9:1 y 2 mL de Acetato de Etilo.
- El contenido de  $\alpha$ -Tocoferol en el aceite de las semillas de la *Luffa Cylindrica* es de 621 ppm.
- El contenido de  $\beta$  - Caroteno en el aceite de las semillas de la *Luffa Cylindrica* es de 58 ppm.
- En el análisis de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas se logro evidenciar la presencia de fitoesteroles en el aceite obtenido de las semillas de la *Luffa Cylindrica*; sin embargo la presencia de impurezas en la fracción de materia insaponificable de este aceite, ocasiono que el porcentaje de similitud de los espectros de masas de la biblioteca del equipo WILEY ACCESS PAC 7 ED a los obtenidos de la muestra fuera menor al 90%, lo cual no permitió una identificación confiable de los fitoesteroles presentes.

## RECOMENDACIONES

- Realizar análisis de los fitoesteroles empleando estándares que permitan su identificación y cuantificación.
- Realizar un estudio de lufarielinas en la materia insaponificable de la fracción que se obtiene por separación en fase sólida con Hexano-Diclorometano.
- Hacer un análisis detallado de la curva oxidativa de la Vitamina E presente en el aceite de las semillas de la *Luffa Cylindrica*, con el fin de determinar si este contenido se mantiene estable a través del tiempo.

## ANEXOS

### ANEXO 1

Tamaño	Sílica Gel	Óxido de Aluminio
Anchura de poro media - Para casos especiales	6 nm 4, 10, 15 nm	6 nm 9. 15 nm
Superficie Específica	500 m <sup>2</sup> /g	200 m <sup>2</sup> /g
Volumen de poro específico	0.75 mL/g	0.2 mL/g
Tamaño de grano - Para HPCCD	15 um aprox. 5 um aprox.	12 um aprox.

**Tabla 10.** Características de los adsorbentes para CCD.

## **Anexo 2**

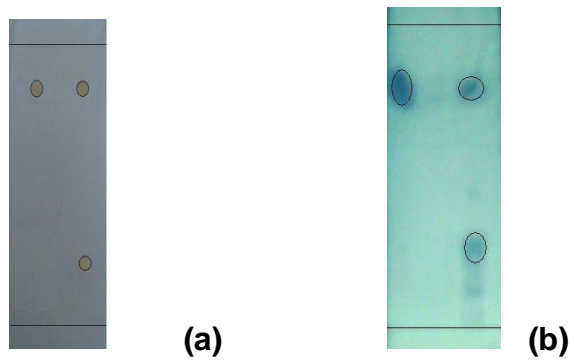
### **Preparación de las placas**

Se prepararon placas cromatográficas de vidrio empleando como adsorbente Sílica gel 60 de tamaño de partícula de 45  $\mu\text{m}$ , utilizando una relación de mezcla de 35g de Sílica por 70 mL de agua destilada; realizando la aplicación sobre la placa y su posterior secado. Las activación de las placas se hicieron en estufa a una temperatura de 120 °C durante 1 hora y la siembra de las muestras a analizar se aplicaron con capilares. Después de activar las placas se realizaron las aplicaciones a una distancia de 1 cm del borde inferior de la placa para su posterior introducción en las cámaras cromatográficas para realizar la separación.

Después de dejar evaporar el eluyente se procedió a la aplicación del revelador; lo cual se hizo utilizando un atomizador. El revelado de las placas se efectuó en estufa a 120 °C durante 2 minutos <sup>(53)</sup>.

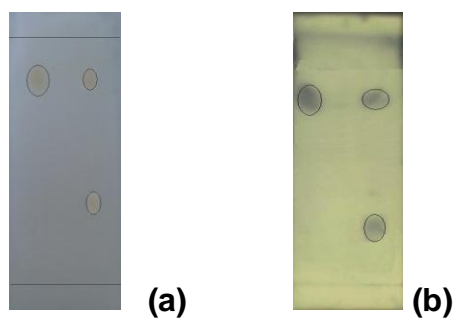


### Anexo 3



**Figura 24.** Cromatoplasas Sistema 1. (a) E1, vapores de Yodo como revelador. (b) E1, Ácido Fosfomolibdico como revelador.

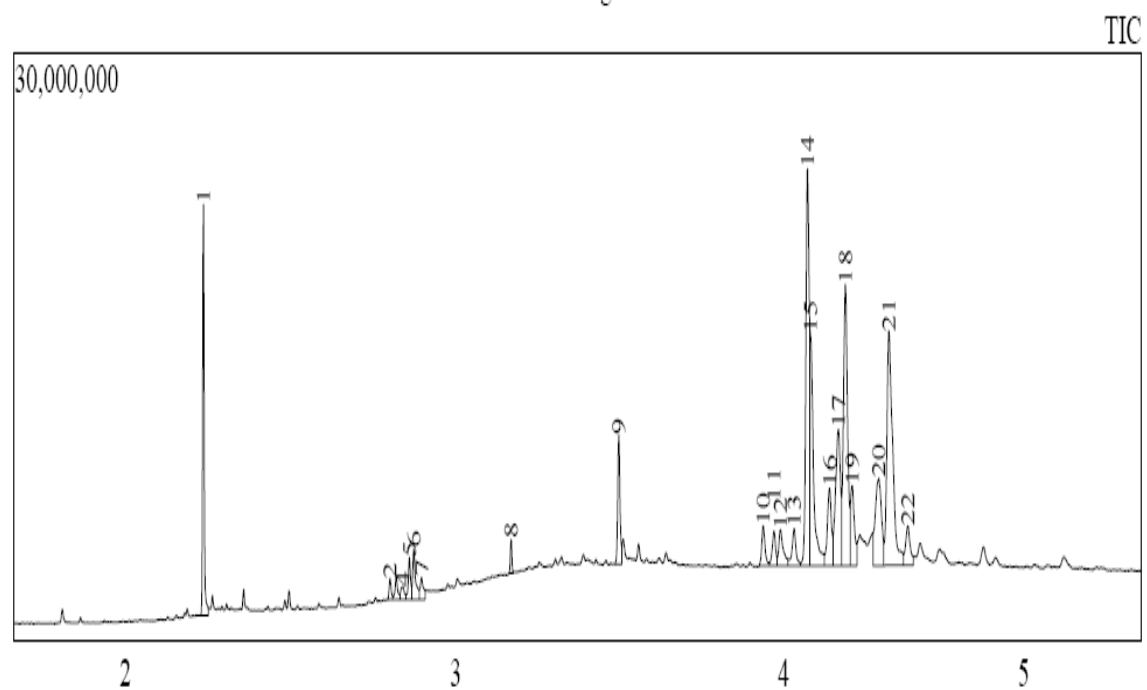
#### Anexo 4



**Figura 25.** Cromatoplasas Sistema 2. (a), E1, Vapores de Yodo como revelador (b), E1, Ácido Fosfomolibdico como revelador.

## Anexo 5

Chromatogram



**Figura 26.** Cromatograma de gases de la fracción de Acetato de Etilo (F2)

## Anexo 6

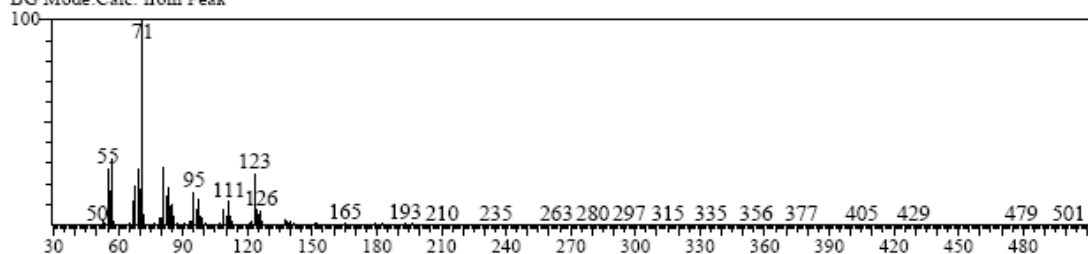
- Pico 1

<< Target >>

Line#1 RTime:17.533(Scan#:1745) MassPeaks:212

RawMode:Averaged 17.525-17.542(1744-1746) BasePeak:71.05(3632645)

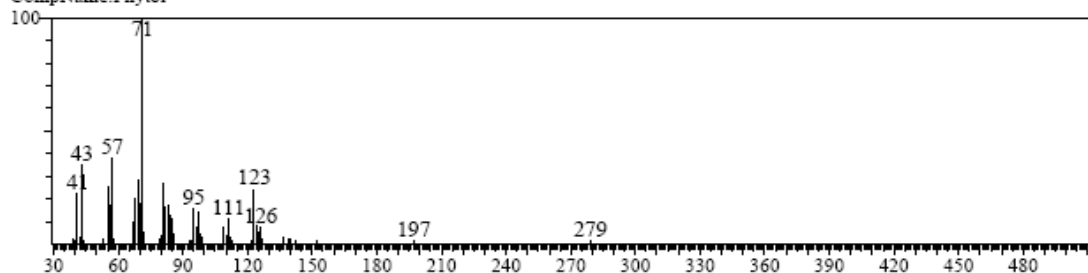
BG Mode:Calc. from Peak



Hit#1 Entry:276776 Library:WILEY7N2.LIB

SI:97 Formula:C20H40O CAS:150-86-7 MolWeight:296 RetIndex:0

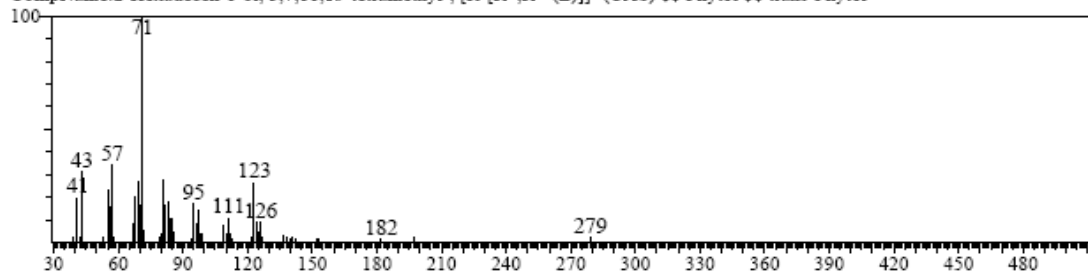
CompName:Phytol



Hit#2 Entry:276778 Library:WILEY7N2.LIB

SI:97 Formula:C20H40O CAS:150-86-7 MolWeight:296 RetIndex:0

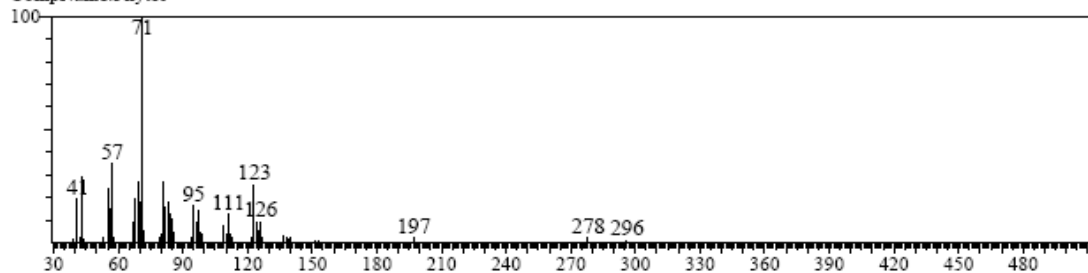
CompName:2-Hexadecen-1-ol, 3,7,11,15-tetramethyl-, [R-[R\*,R\*-(E)]]- (CAS) \$\$ Phytol \$\$ trans-Phytol



Hit#3 Entry:276775 Library:WILEY7N2.LIB

SI:97 Formula:C20H40O CAS:150-86-7 MolWeight:296 RetIndex:0

CompName:Phytol



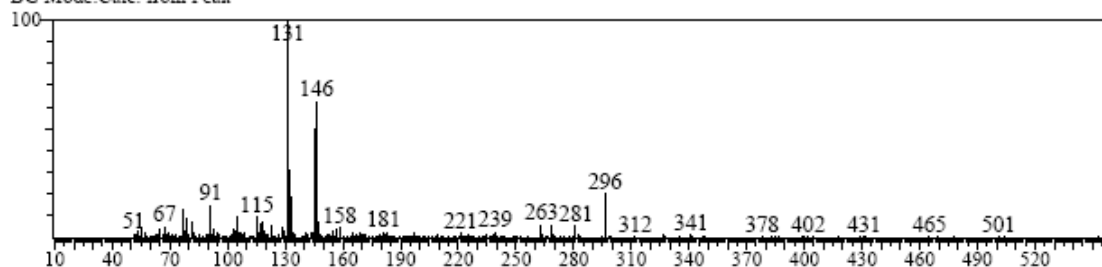
- **Pico 2**

<< Target >>

Line# 2 RTime: 21.008 (Scan#: 2162) MassPeaks: 231

RawMode: Averaged 21.000-21.017 (2161-2163) BasePeak: 131.05 (165288)

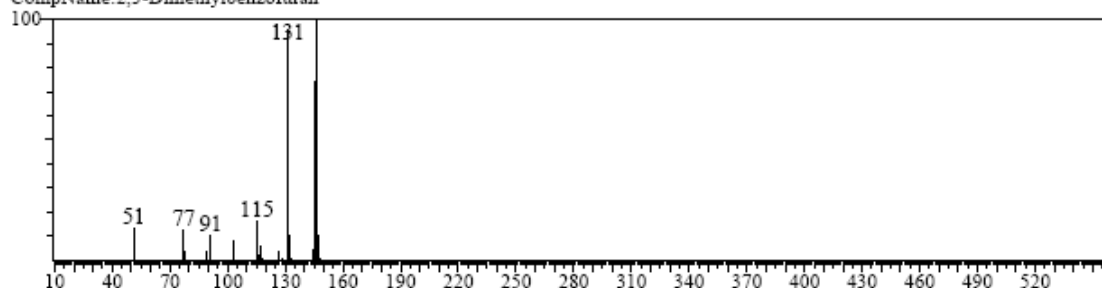
BG Mode: Calc. from Peak



Hit# 1 Entry: 46520 Library: WILEY7N2.LIB

SI: 74 Formula: C<sub>10</sub>H<sub>10</sub>O CAS: 0-00-0 MolWeight: 146 RetIndex: 0

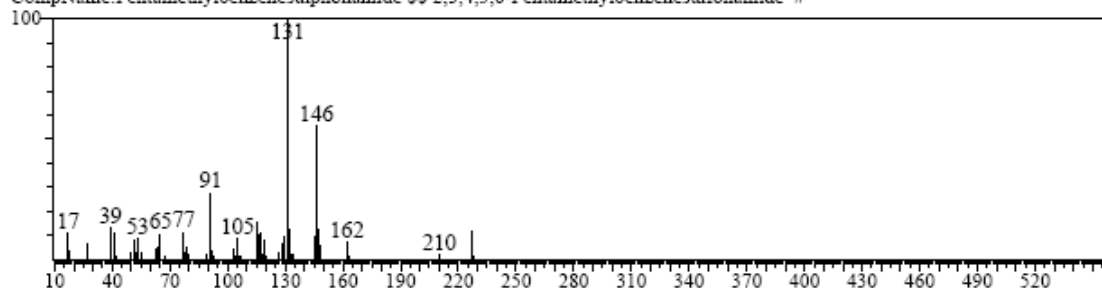
CompName: 2,3-Dimethylbenzofuran



Hit# 2 Entry: 171886 Library: WILEY7N2.LIB

SI: 74 Formula: C<sub>11</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>2</sub>S CAS: 208173-25-5 MolWeight: 227 RetIndex: 0

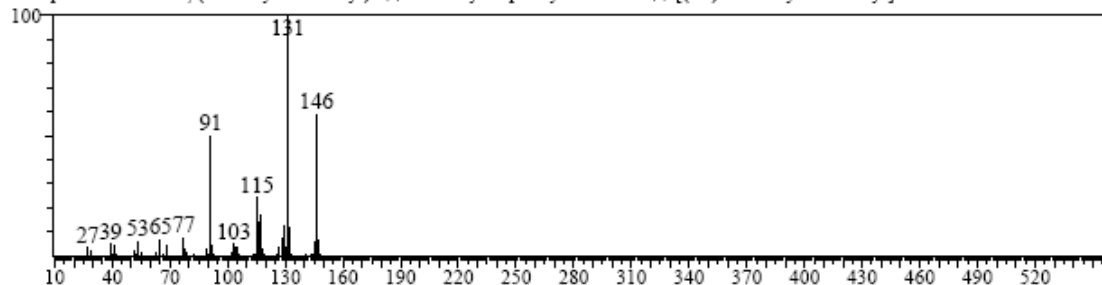
CompName: Pentamethylbenzenesulphonamide \$\$ 2,3,4,5,6-Pentamethylbenzenesulfonamide #



Hit# 3 Entry: 46608 Library: WILEY7N2.LIB

SI: 74 Formula: C<sub>11</sub>H<sub>14</sub> CAS: 56253-64-6 MolWeight: 146 RetIndex: 0

CompName: Benzene, (2-methyl-1-butenyl)- \$\$ 2-Methyl-1-phenyl-1-butene \$\$ [(1E)-2-Methyl-1-butenyl]benzene #



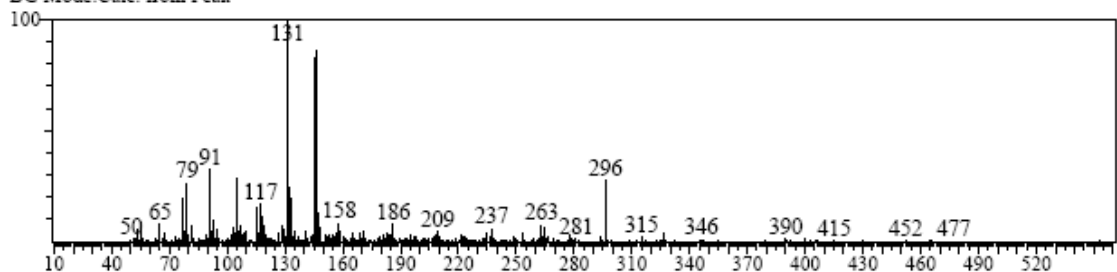
### • Pico 3

<< Target >>

Line#3 R.Time:21.125(Scan#:2176) MassPeaks:240

RawMode:Averaged 21.117-21.133(2175-2177) BasePeak:131.05(105929)

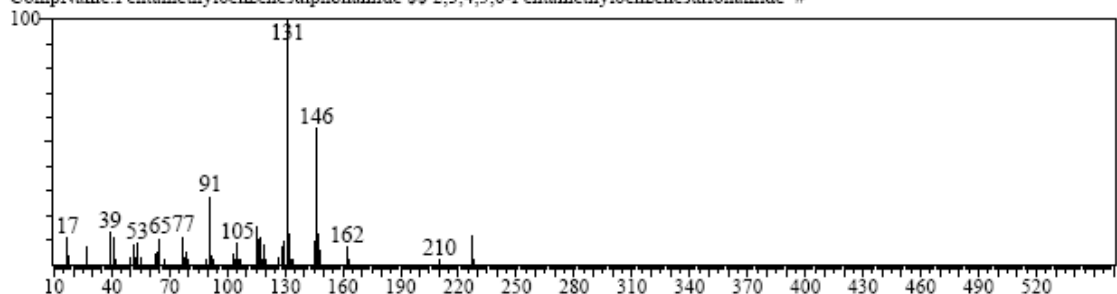
BG Mode:Calc. from Peak



Hit#1 Entry:171886 Library:WILEY7N2.LIB

SI:73 Formula:C11H17NO2S CAS:208173-25-5 MolWeight:227 RetIndex:0

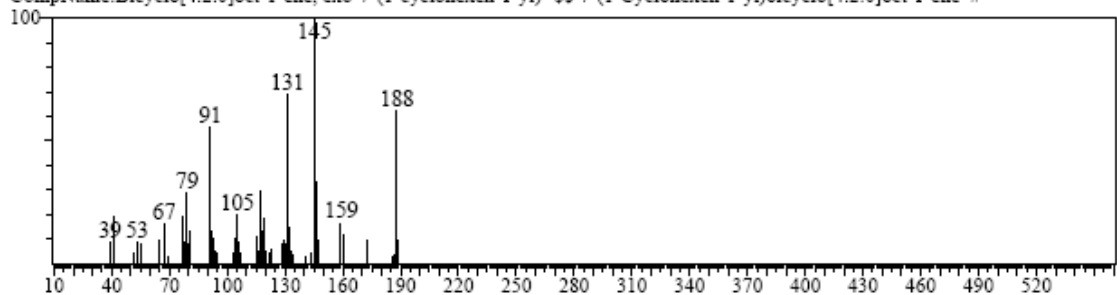
CompName:Pentamethylbenzenesulphonamide \$\$ 2,3,4,5,6-Pentamethylbenzenesulphonamide #



Hit#2 Entry:108160 Library:WILEY7N2.LIB

SI:72 Formula:C14H20 CAS:0-00-0 MolWeight:188 RetIndex:0

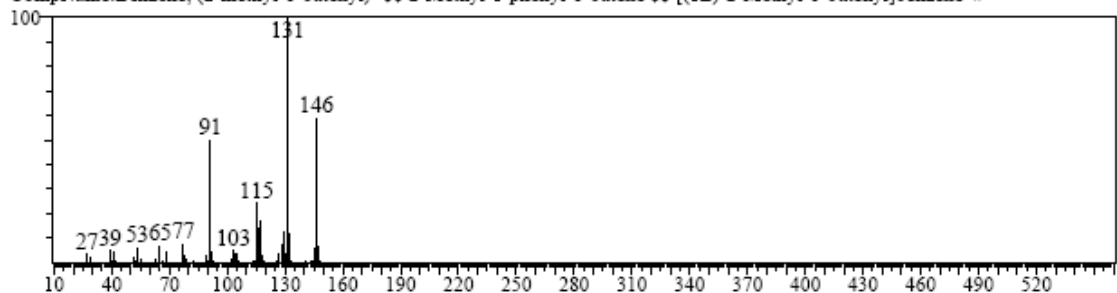
CompName:Bicyclo[4.2.0]oct-1-ene, exo-7-(1-cyclohexen-1-yl)- \$\$ 7-(1-Cyclohexen-1-yl)bicyclo[4.2.0]oct-1-ene #



Hit#3 Entry:46608 Library:WILEY7N2.LIB

SI:72 Formula:C11H14 CAS:56253-64-6 MolWeight:146 RetIndex:0

CompName:Benzene, (2-methyl-1-butenyl)- \$\$ 2-Methyl-1-phenyl-1-butene \$\$ [(1E)-2-Methyl-1-butenyl]benzene #



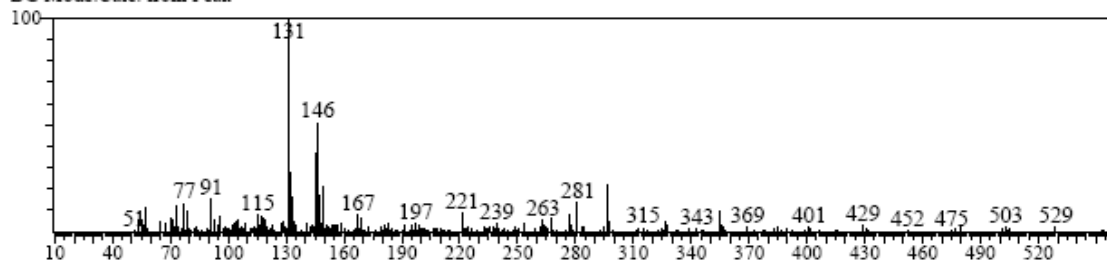
## • Pico 4

<< Target >>

Line# 4 R.Time:21.242(Scan#:2190) MassPeaks:223

RawMode:Averaged 21.233-21.250(2189-2191) BasePeak:131.05(54595)

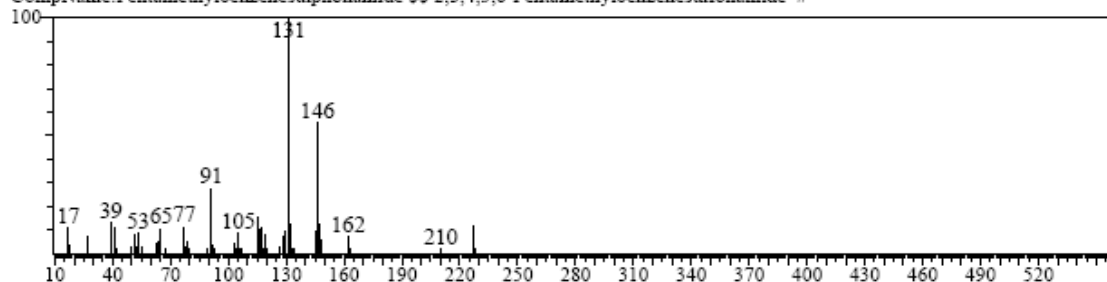
BG Mode:Calc. from Peak



Hit#1 Entry:171886 Library:WILEY7N2.LIB

SI:66 Formula:C11H17NO2S CAS:208173-25-5 MolWeight:227 RefIndex:0

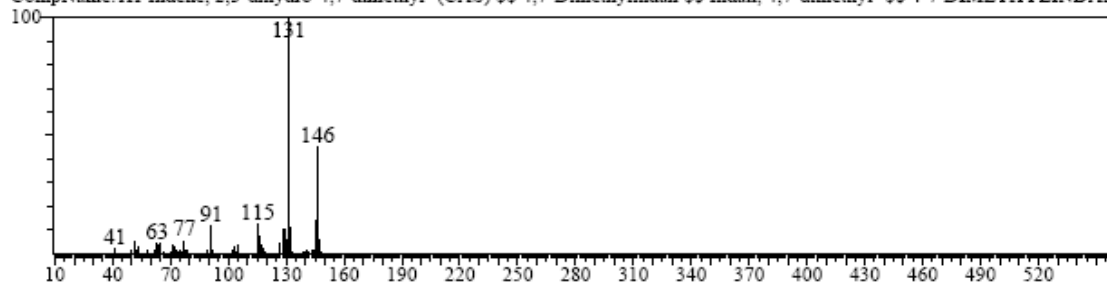
CompName:Pentamethylbenzenesulphonamide \$\$ 2,3,4,5,6-Pentamethylbenzenesulfonamide #



Hit#2 Entry:46673 Library:WILEY7N2.LIB

SI:65 Formula:C11H14 CAS:6682-71-9 MolWeight:146 RefIndex:0

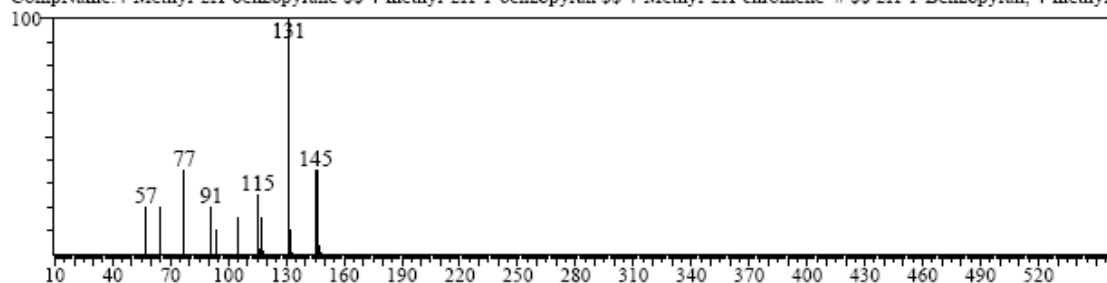
CompName:1H-Indene, 2,3-dihydro-4,7-dimethyl- (CAS) \$\$ 4,7-Dimethylindan \$\$ Indan, 4,7-dimethyl- \$\$ 4-7 DIMETHYLINDAN



Hit#3 Entry:46564 Library:WILEY7N2.LIB

SI:64 Formula:C10H10O CAS:21776-94-3 MolWeight:146 RefIndex:0

CompName:4-Methyl-2H-benzopyrane \$\$ 4-methyl-2H-1-benzopyran \$\$ 4-Methyl-2H-chromene # \$\$ 2H-1-Benzopyran, 4-methyl-



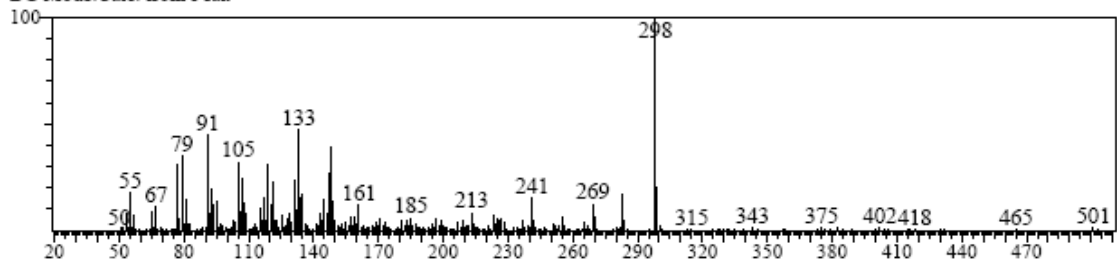
- **Pico 5**

<< Target >>

Line#:5 R.Time:21.367(Scan#:2205) MassPeaks:255

RawMode:Averaged 21.358-21.375(2204-2206) BasePeak:298.10(127683)

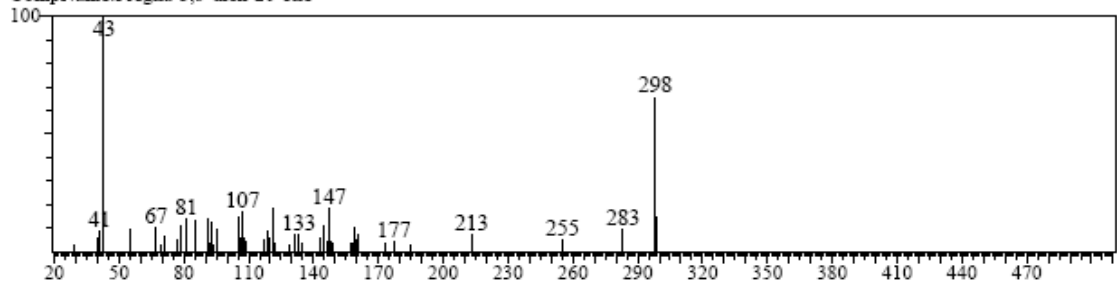
BG Mode:Calc. from Peak



Hit#:1 Entry:279663 Library:WILEY7N2.LIB

SI:79 Formula:C21H30O CAS:1093-87-4 MolWeight:298 RefIndex:0

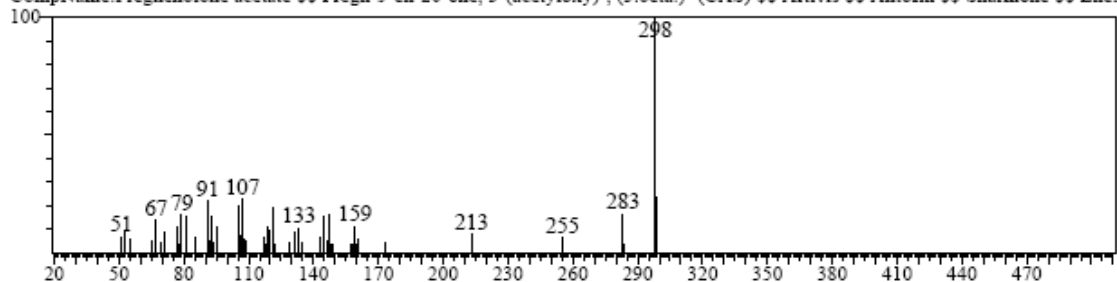
CompName:Pregna-3,5-dien-20-one



Hit#:2 Entry:347932 Library:WILEY7N2.LIB

SI:79 Formula:C23H34O3 CAS:1778-02-5 MolWeight:358 RefIndex:0

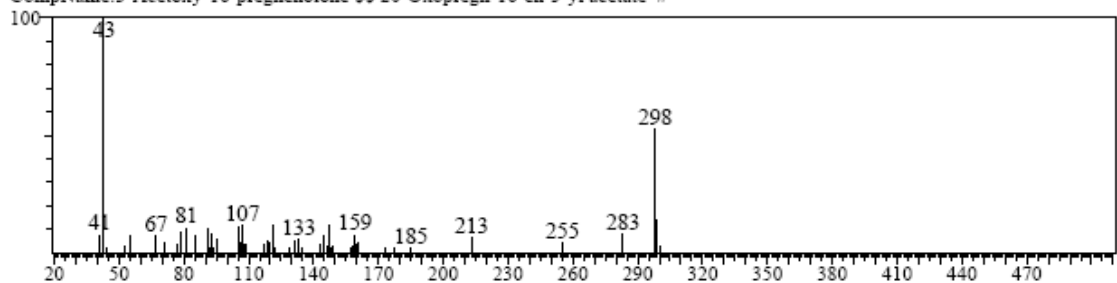
CompName:Pregnenolone acetate \$\$ Pregn-5-en-20-one, 3-(acetyloxy)-, (3.beta.)- (CAS) \$\$ Artivis \$\$ Antofin \$\$ Sharmone \$\$ Ene:



Hit#:3 Entry:348000 Library:WILEY7N2.LIB

SI:79 Formula:C23H34O3 CAS:99210-71-6 MolWeight:358 RefIndex:0

CompName:3-Acetoxy-16-pregnenolone \$\$ 20-Oxopregn-16-en-3-yl acetate #





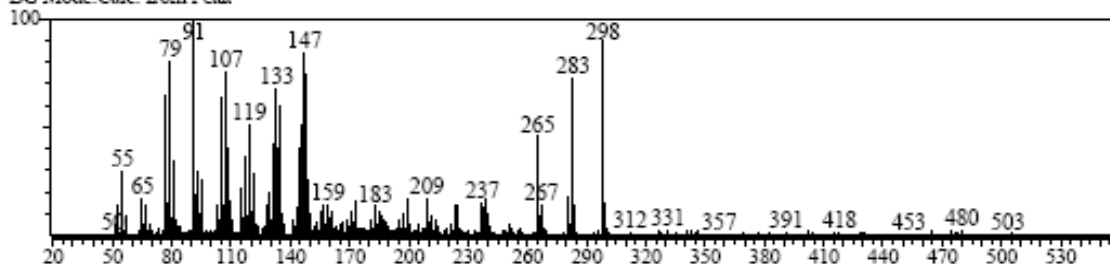
## Pico 6

<< Target >>

Line# 6 R.Time: 21.450 (Scan#: 2215) MassPeaks: 281

RawMode: Averaged 21.442-21.458 (2214-2216) BasePeak: 91.05 (76286)

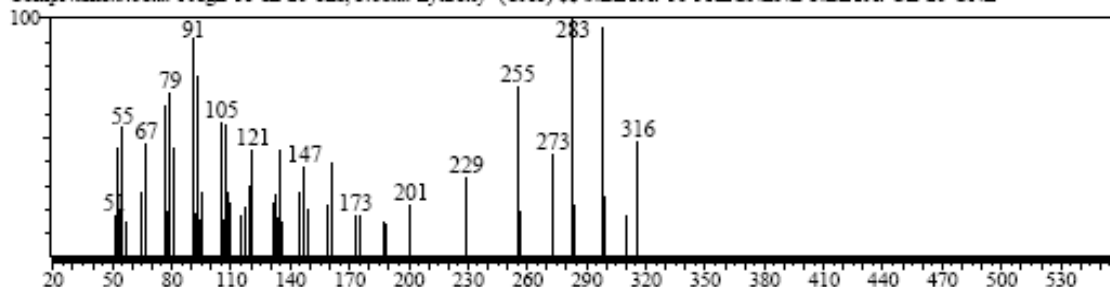
BG Mode: Calc. from Peak



Hit# 1 Entry: 302995 Library: WILEY7N2.LIB

SI: 70 Formula: C<sub>21</sub>H<sub>32</sub>O<sub>2</sub> CAS: 566-59-6 MolWeight: 316 RefIndex: 0

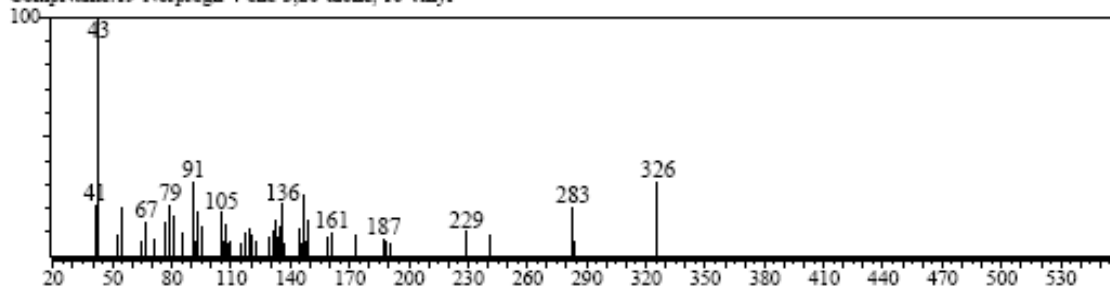
CompName: 5.β-Pregn-16-en-20-one, 3.β-hydroxy- (CAS) 5.β-BETA.-16-PREGNENE-3.BETA.-OL-20-ONE



Hit# 2 Entry: 314949 Library: WILEY7N2.LIB

SI: 70 Formula: C<sub>22</sub>H<sub>30</sub>O<sub>2</sub> CAS: 13258-85-0 MolWeight: 326 RefIndex: 0

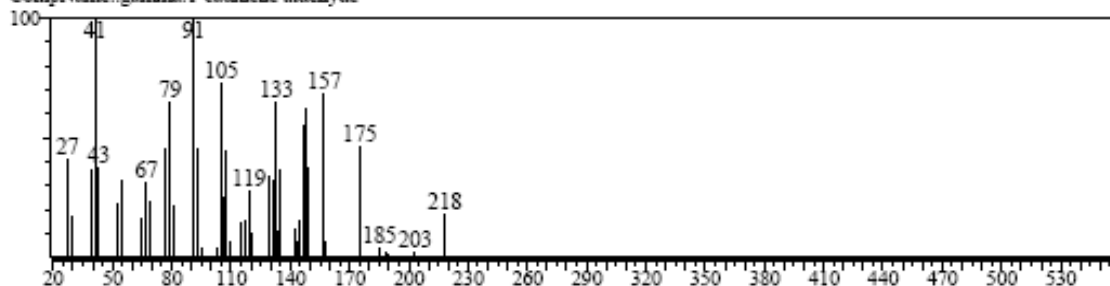
CompName: 19-Norpregn-4-ene-3,20-dione, 10-vinyl-



Hit# 3 Entry: 156919 Library: WILEY7N2.LIB

SI: 69 Formula: C<sub>15</sub>H<sub>22</sub>O CAS: 0-00-0 MolWeight: 218 RefIndex: 0

CompName: γ-gamuna.1-cadinene aldehyde



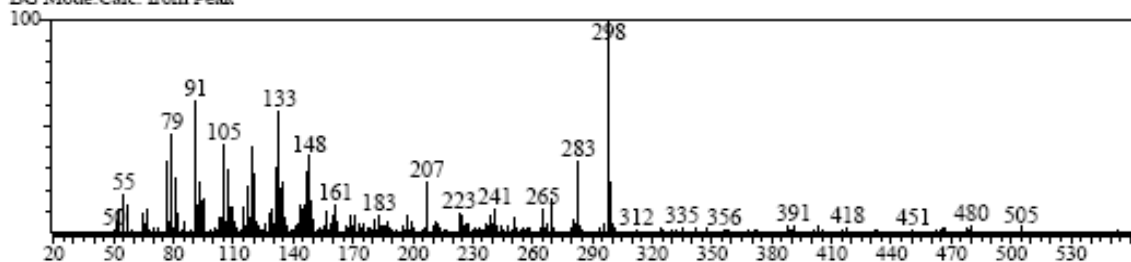
- **Pico 7**

<< Target >>

Line#: 7 R.Time: 21.592 (Scan#: 2232) MassPeaks: 236

RawMode: Averaged 21.583-21.600 (2231-2233) BasePeak: 298.15 (41213)

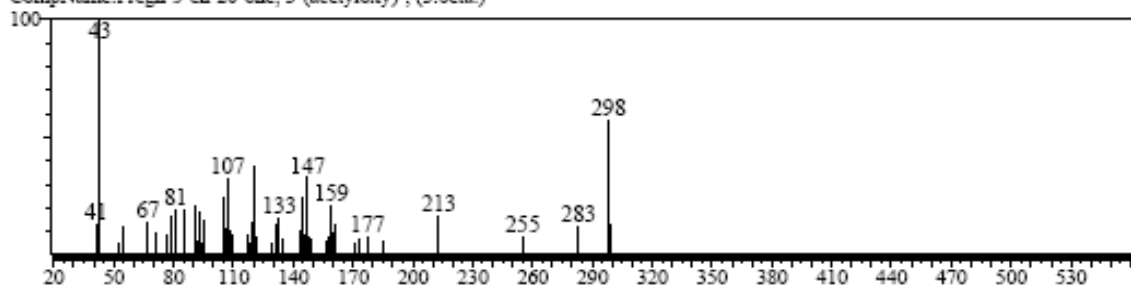
BG Mode: Calc. from Peak



Hit#1 Entry: 347933 Library: WILEY7N2.LIB

SI: 73 Formula: C<sub>23</sub>H<sub>34</sub>O<sub>3</sub> CAS: 1778-02-5 MolWeight: 358 RetIndex: 0

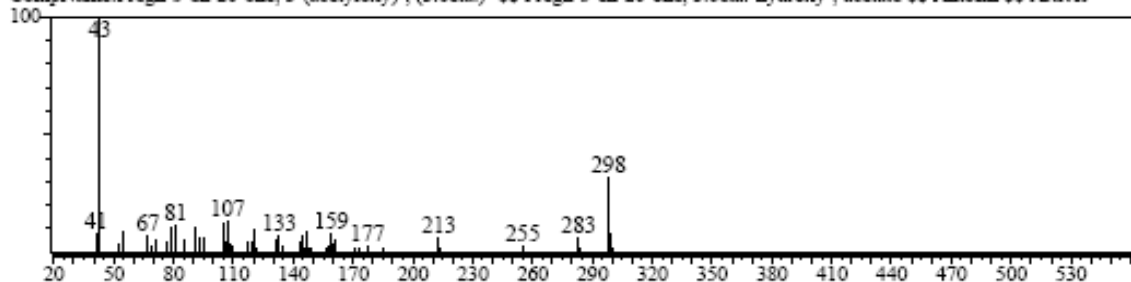
CompName: Pregn-5-en-20-one, 3-(acetyloxy)-, (3.β.)-



Hit#2 Entry: 347936 Library: WILEY7N2.LIB

SI: 72 Formula: C<sub>23</sub>H<sub>34</sub>O<sub>3</sub> CAS: 1778-02-5 MolWeight: 358 RetIndex: 0

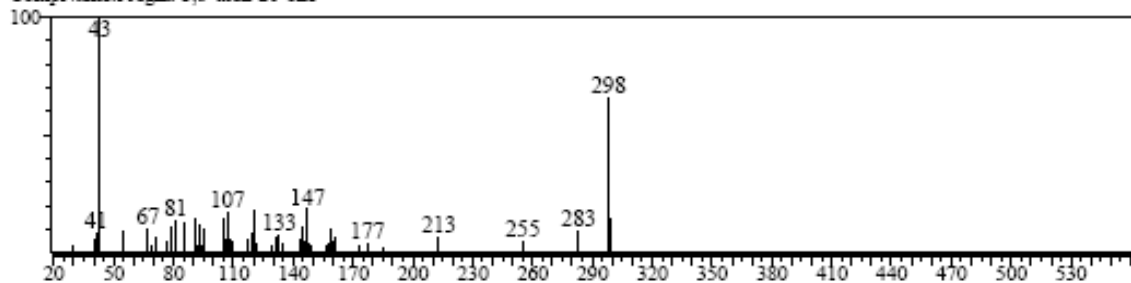
CompName: Pregn-5-en-20-one, 3-(acetyloxy)-, (3.β.)- \$\$ Pregn-5-en-20-one, 3.β.-hydroxy-, acetate \$\$ Antofin \$\$ Artivis



Hit#3 Entry: 279663 Library: WILEY7N2.LIB

SI: 71 Formula: C<sub>21</sub>H<sub>30</sub>O CAS: 1093-87-4 MolWeight: 298 RetIndex: 0

CompName: Pregn-3,5-dien-20-one



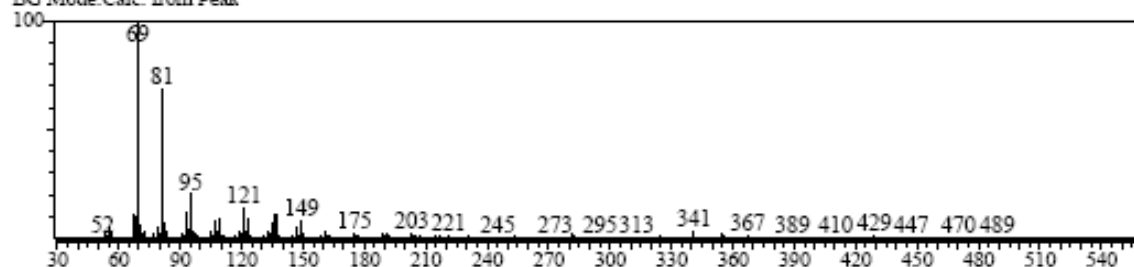
- **Pico 8**

<< Target >>

Line#:8 R.Time:23.258(Scan#:2432) MassPeaks:259

RawMode:Averaged 23.250-23.267(2431-2433) BasePeak:69.05(333662)

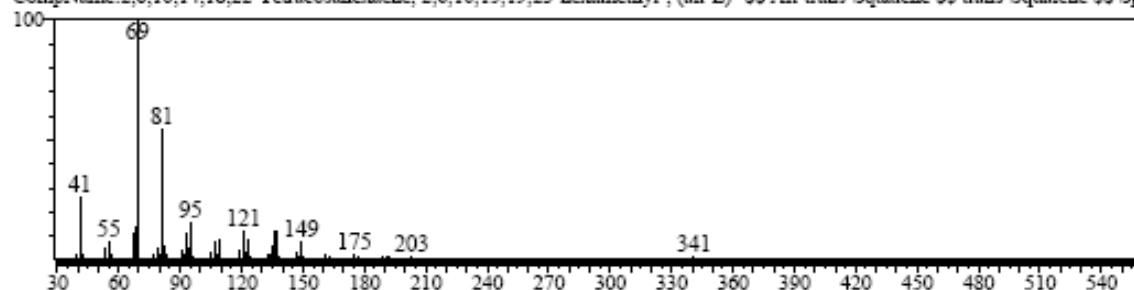
BG Mode:Calc. from Peak



Hit#:1 Entry:385945 Library:WILEY7N2.LIB

SI:94 Formula:C30H50 CAS:111-02-4 MolWeight:410 RefIndex:0

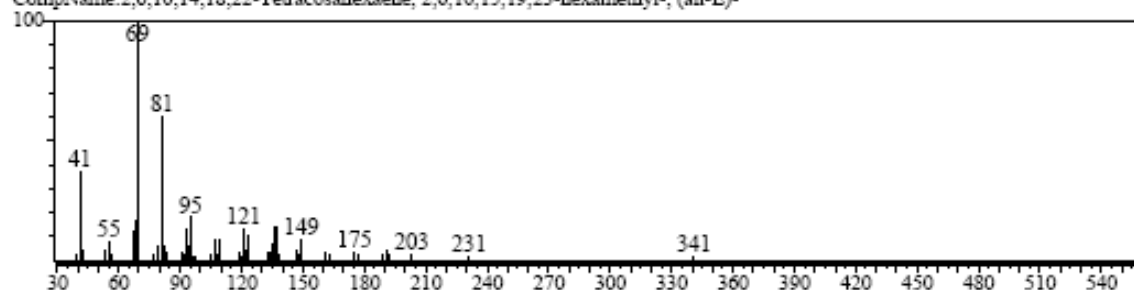
CompName:2,6,10,14,18,22-Tetracosahexaene, 2,6,10,15,19,23-hexamethyl-, (all-E)- \$\$ All-trans-Squalene \$\$ trans-Squalene \$\$ Spi



Hit#:2 Entry:385946 Library:WILEY7N2.LIB

SI:93 Formula:C30H50 CAS:111-02-4 MolWeight:410 RefIndex:0

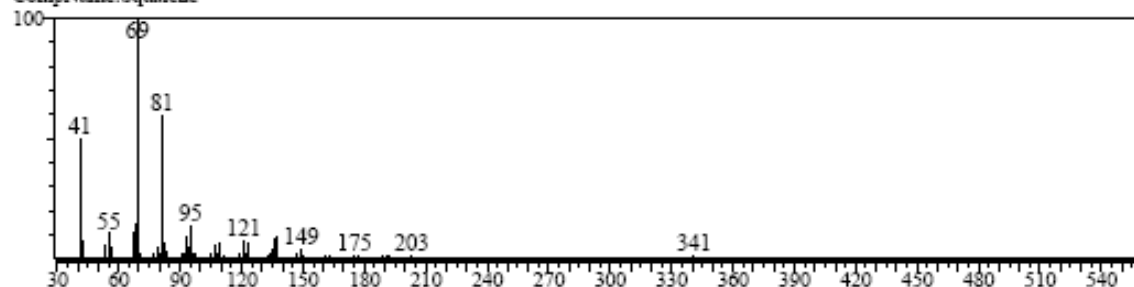
CompName:2,6,10,14,18,22-Tetracosahexaene, 2,6,10,15,19,23-hexamethyl-, (all-E)-



Hit#:3 Entry:385939 Library:WILEY7N2.LIB

SI:93 Formula:C30H50 CAS:7683-64-9 MolWeight:410 RefIndex:0

CompName:Squalene



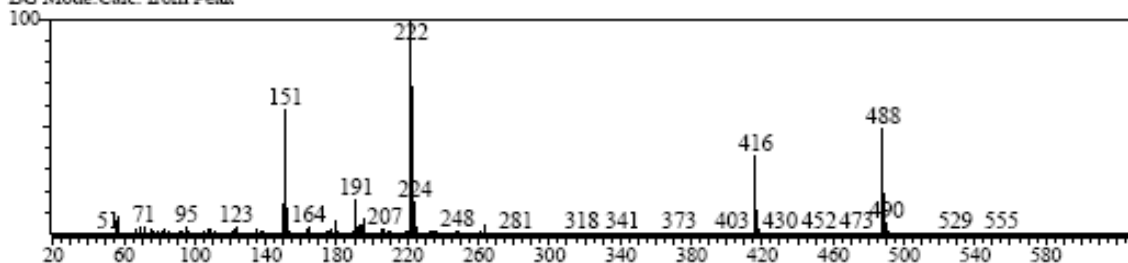
- **Pico 9**

<< Target >>

Line# 9 RTime: 25.267 (Scan#: 2673) MassPeaks: 336

RawMode: Averaged 25.258-25.275 (2672-2674) BasePeak: 222.00 (1005763)

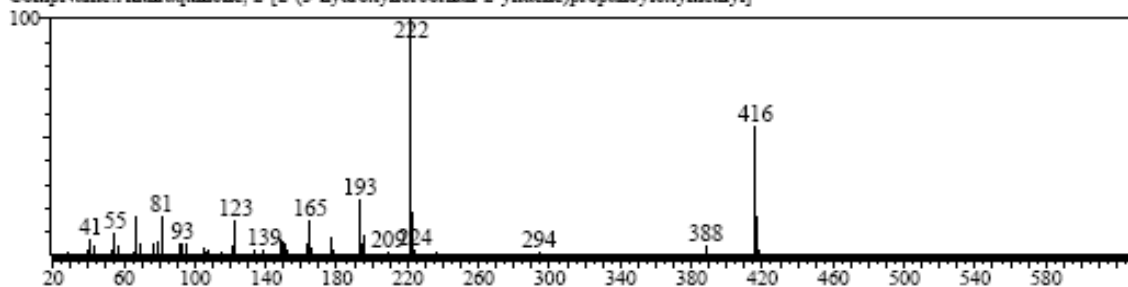
BG Mode: Calc. from Peak



Hit# 1 Entry: 389354 Library: WILEY7N2.LIB

SI: 66 Formula: C<sub>26</sub>H<sub>24</sub>O<sub>5</sub> CAS: 0-00-0 MolWeight: 416 RetIndex: 0

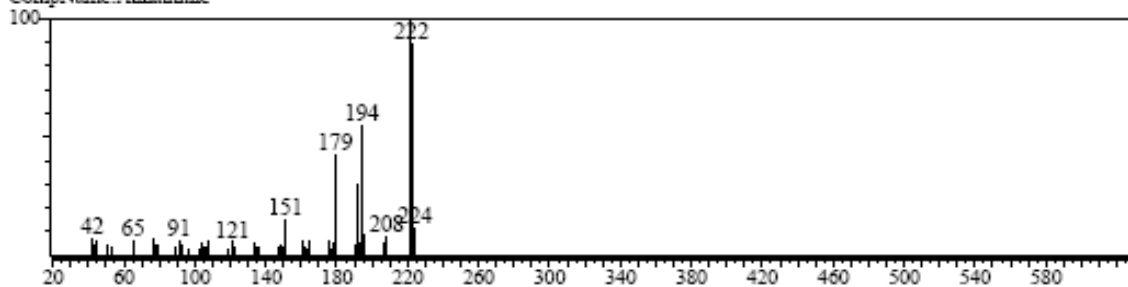
CompName: Anthraquinone, 2-[2-(3-hydroxynorbornan-2-ylidene)propanoyloxymethyl]-



Hit# 2 Entry: 165287 Library: WILEY7N2.LIB

SI: 58 Formula: C<sub>12</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub> CAS: 642-30-8 MolWeight: 223 RetIndex: 0

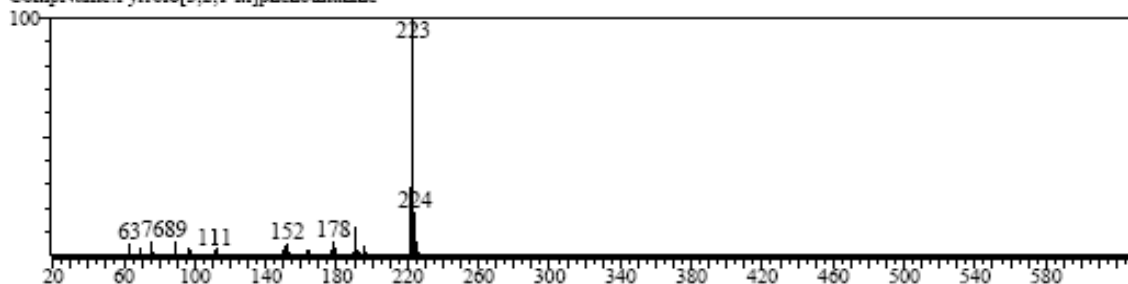
CompName: Anhalinine



Hit# 3 Entry: 165520 Library: WILEY7N2.LIB

SI: 58 Formula: C<sub>14</sub>H<sub>9</sub>NS CAS: 19609-07-5 MolWeight: 223 RetIndex: 0

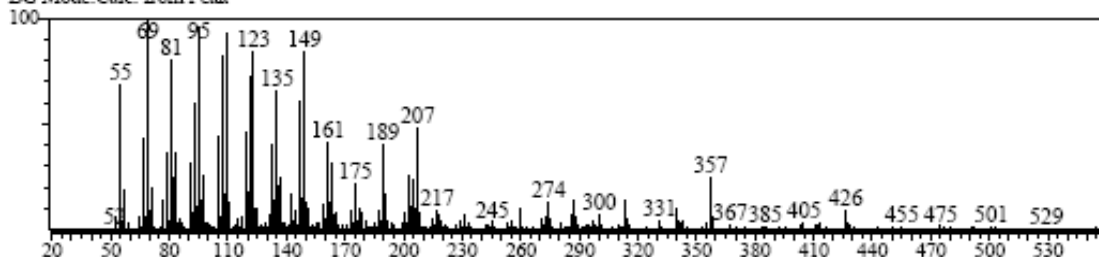
CompName: Pyrrolo[3,2,1-k]phenothiazine



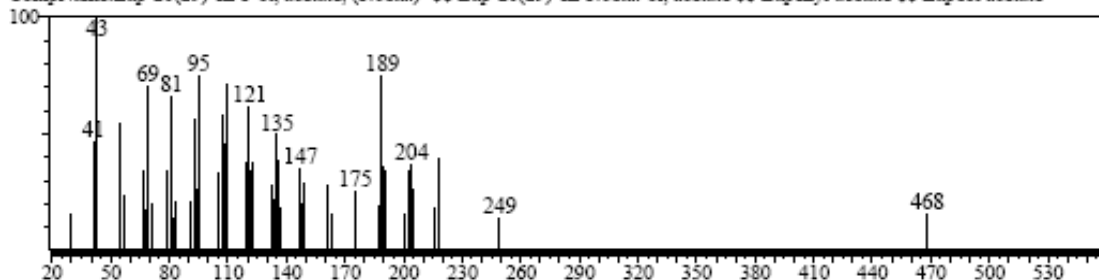
- **Pico 10**

<< Target >>

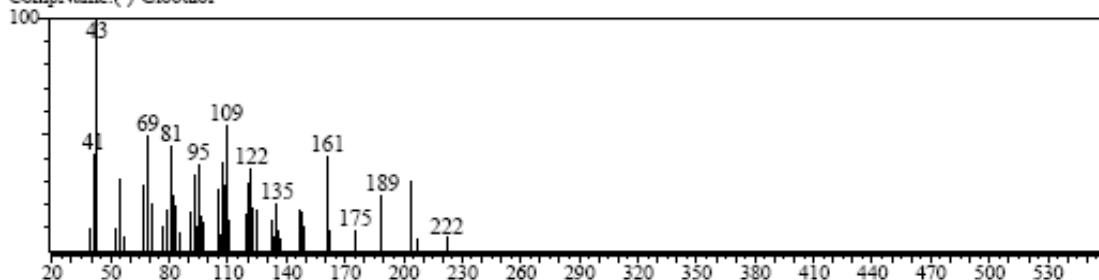
Line#:10 R.Time:27.958(Scan#:2996) MassPeaks:296  
RawMode:Averaged 27.950-27.967(2995-2997) BasePeak:69.05(77884)  
BG Mode:Calc. from Peak



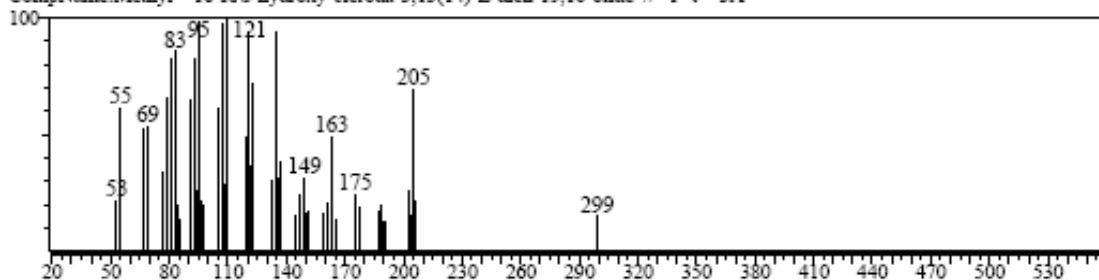
Hit#1 Entry:410155 Library:WILEY7N2.LIB  
SI:81 Formula:C32H52O2 CAS:1617-68-1 MolWeight:468 RefIndex:0  
CompName:Lup-20(29)-en-3-ol, acetate, (3. beta.)- \$\$ Lup-20(29)-en-3. beta.-ol, acetate \$\$ Lupenyl acetate \$\$ Lupeol acetate



Hit#2 Entry:164299 Library:WILEY7N2.LIB  
SI:81 Formula:C15H26O CAS:489-41-8 MolWeight:222 RefIndex:0  
CompName:(-)-Globulol



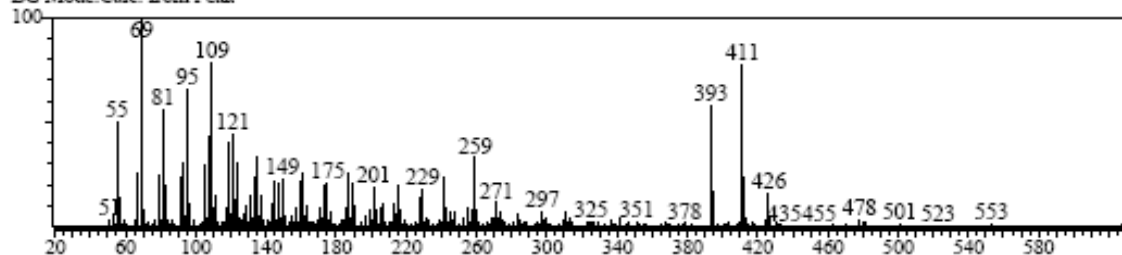
Hit#3 Entry:349675 Library:WILEY7N2.LIB  
SI:80 Formula:C22H32O4 CAS:0-00-0 MolWeight:360 RefIndex:0  
CompName:Methyl 16-R/S-hydroxy-cleroda-3,13(14)-Z-dien-15,16-olide // P V - 3A



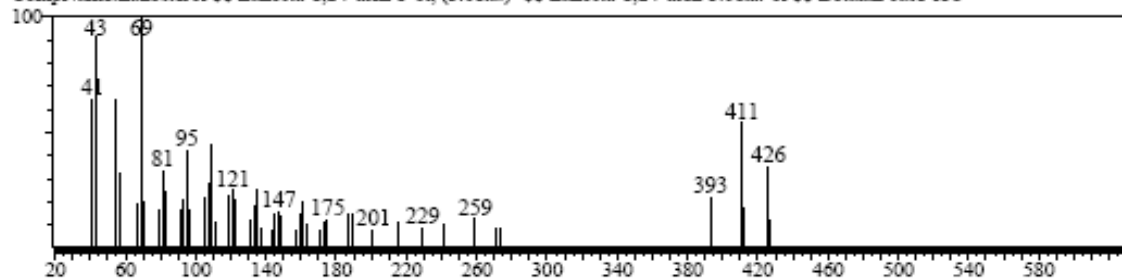
- **Pico 11**

<< Target >>

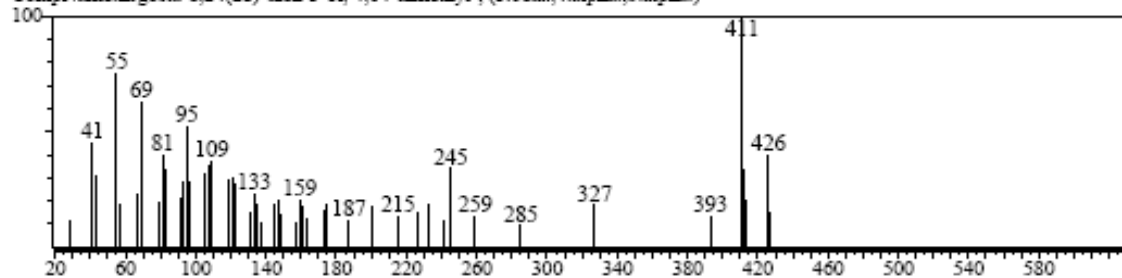
Line#:11 R.Time:28.158(Scan#:3020) MassPeaks:315  
RawMode:Averaged 28.150-28.167(3019-3021) BasePeak:69.05(69882)  
BG Mode:Calc. from Peak



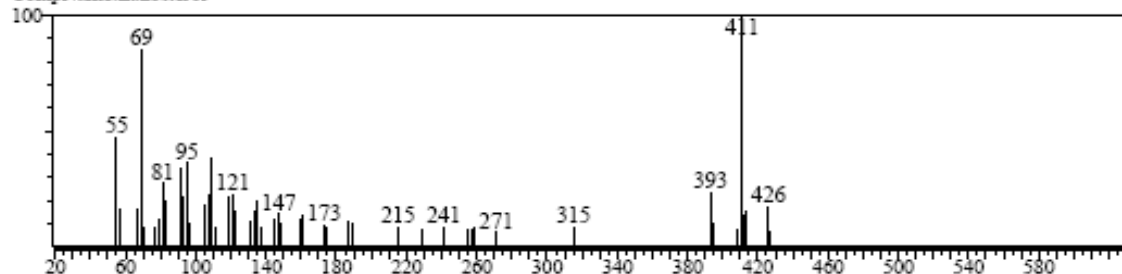
Hit#1 Entry:394311 Library:WILEY7N2.LIB  
SI:84 Formula:C30H50O CAS:79-63-0 MolWeight:426 RefIndex:0  
CompName:Lanosterol \$\$ Lanosta-8,24-dien-3-ol, (3.beta.)- \$\$ Lanosta-8,24-dien-3.beta.-ol \$\$ Botolan base 138



Hit#2 Entry:394309 Library:WILEY7N2.LIB  
SI:81 Formula:C30H50O CAS:16910-32-0 MolWeight:426 RefIndex:0  
CompName:Ergosta-8,24(28)-dien-3-ol, 4,14-dimethyl-, (3.beta.,4.alpha.,5.alpha.)-



Hit#3 Entry:394312 Library:WILEY7N2.LIB  
SI:80 Formula:C30H50O CAS:79-63-0 MolWeight:426 RefIndex:0  
CompName:Lanosterol



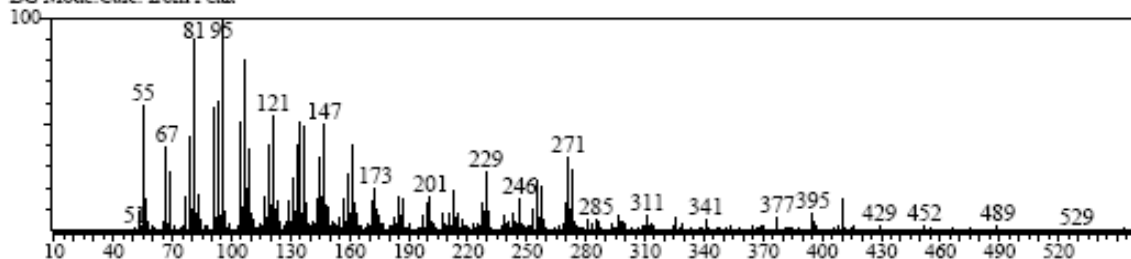
- **Pico 12**

<< Target >>

Line# 12 R.Time: 28.275 (Scan#: 3034) MassPeaks: 296

RawMode: Averaged 28.267-28.283 (3033-3035) BasePeak: 95.10 (64111)

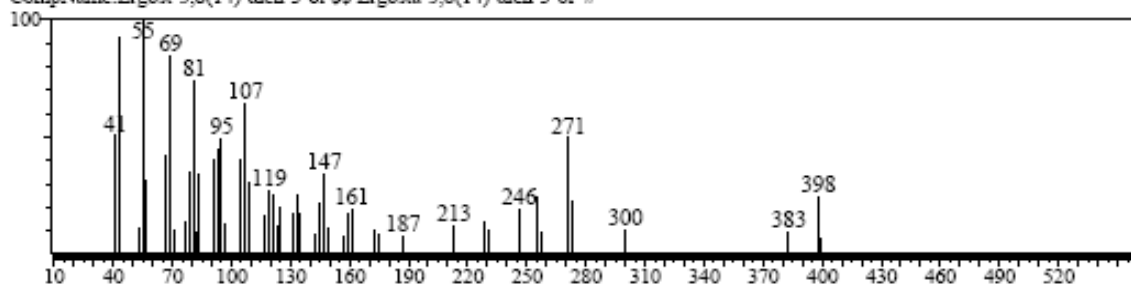
BG Mode: Calc. from Peak



Hit# 1 Entry: 378940 Library: WILEY7N2.LIB

SI: 77 Formula: C<sub>28</sub>H<sub>46</sub>O CAS: 177962-83-3 MolWeight: 398 RefIndex: 0

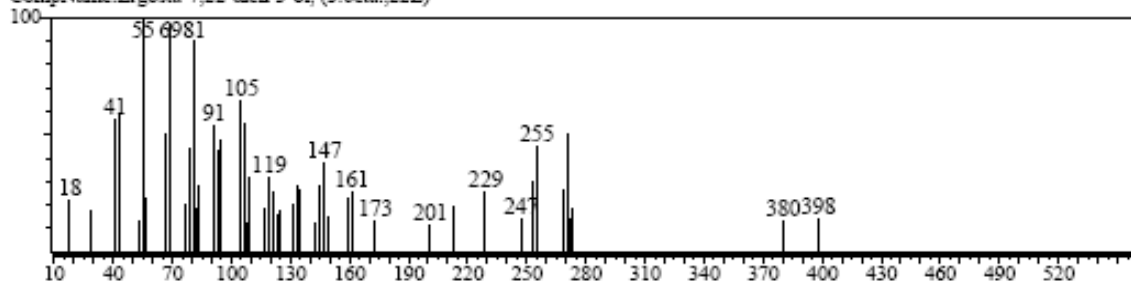
CompName: Ergost-5,8(14)-dien-3-ol \$S\$ Ergosta-5,8(14)-dien-3-ol #



Hit# 2 Entry: 378840 Library: WILEY7N2.LIB

SI: 77 Formula: C<sub>28</sub>H<sub>46</sub>O CAS: 17608-76-3 MolWeight: 398 RefIndex: 0

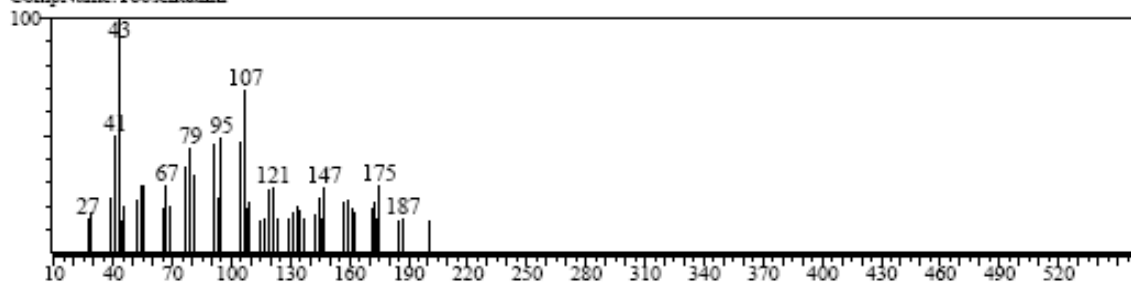
CompName: Ergosta-7,22-dien-3-ol, (3β,22E)-



Hit# 3 Entry: 429433 Library: WILEY7N2.LIB

SI: 77 Formula: C<sub>30</sub>H<sub>38</sub>O<sub>11</sub> CAS: 0-00-0 MolWeight: 574 RefIndex: 0

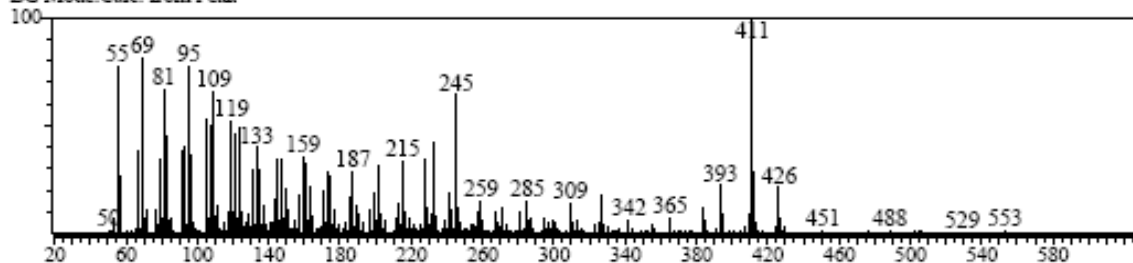
CompName: Toosendanin



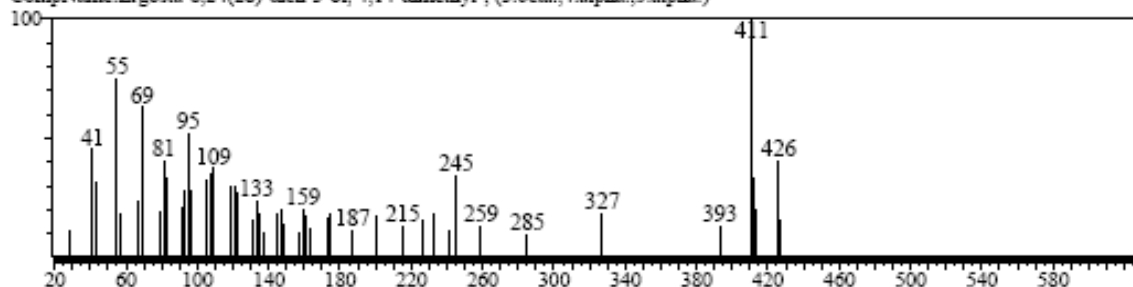
- **Pico 13**

<< Target >>

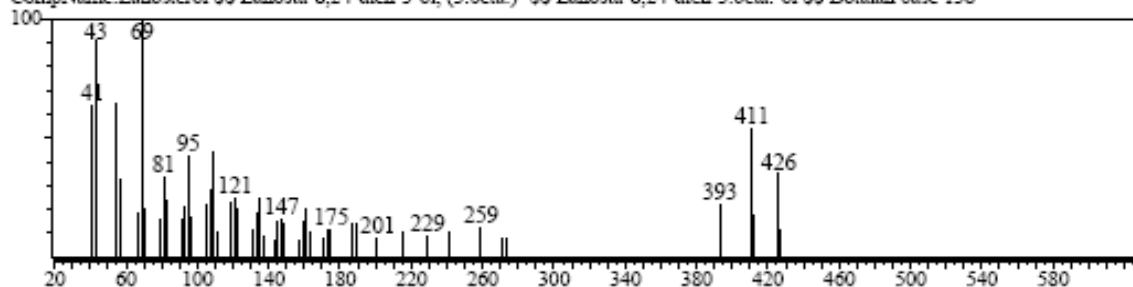
Line# 13 RTime: 28.533 (Scan#: 3065) MassPeaks: 321  
RawMode: Averaged 28.525-28.542 (3064-3066) BasePeak: 411.25 (59718)  
BG Mode: Calc. from Peak



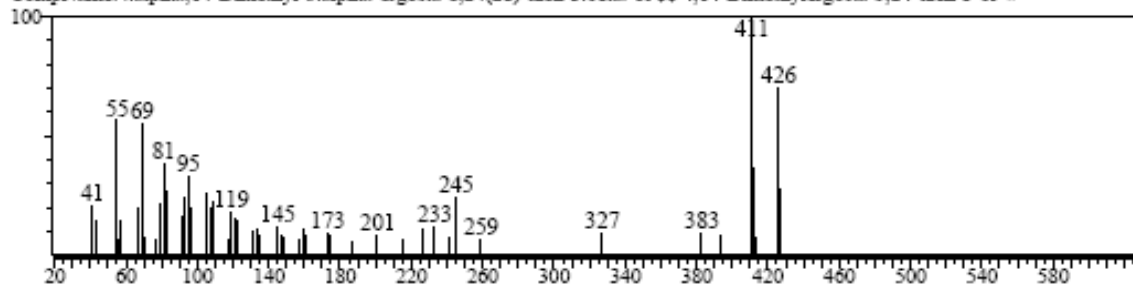
Hit#1 Entry: 394309 Library: WILEY7N2.LIB  
SI: 85 Formula: C<sub>30</sub>H<sub>50</sub>O CAS: 16910-32-0 MolWeight: 426 RetIndex: 0  
CompName: Ergosta-8,24(28)-dien-3-ol, 4,14-dimethyl-, (3.beta.,4.alpha.,5.alpha.)-



Hit#2 Entry: 394311 Library: WILEY7N2.LIB  
SI: 76 Formula: C<sub>30</sub>H<sub>50</sub>O CAS: 79-63-0 MolWeight: 426 RetIndex: 0  
CompName: Lanosterol \$\$ Lanosta-8,24-dien-3-ol, (3.beta.)- \$\$ Lanosta-8,24-dien-3.beta.-ol \$\$ Botolan base 138



Hit#3 Entry: 394398 Library: WILEY7N2.LIB  
SI: 75 Formula: C<sub>30</sub>H<sub>50</sub>O CAS: 0-00-0 MolWeight: 426 RetIndex: 0  
CompName: 4.alpha.,14-Dimethyl-5.alpha.-ergosta-8,24(28)-dien-3.beta.-ol \$\$ 4,14-Dimethylergosta-5,24-dien-3-ol #





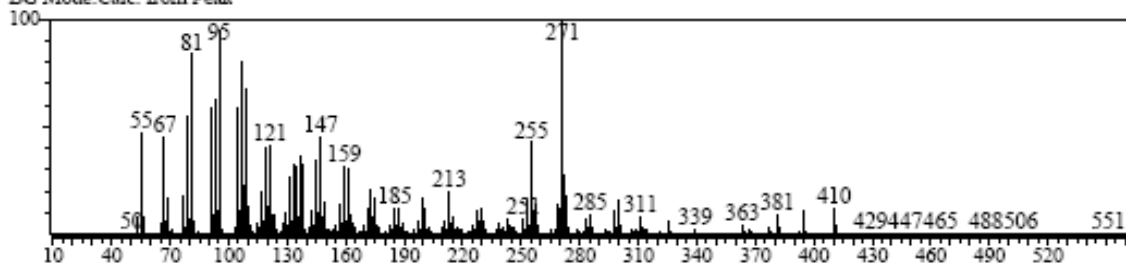
- **Pico 14**

<< Target >>

Line# 14 RTime: 28.783 (Scan#: 3095) MassPeaks: 334

RawMode: Averaged 28.775-28.792 (3094-3096) BasePeak: 271.15 (486211)

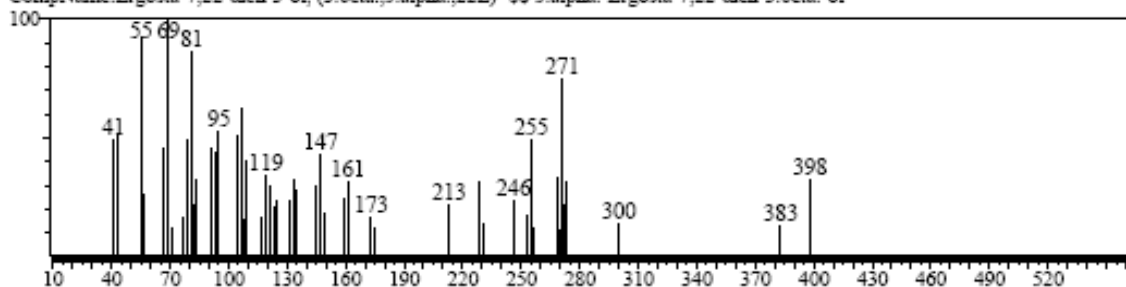
BG Mode: Calc. from Peak



Hit# 1 Entry: 378845 Library: WILEY7N2.LIB

SI: 79 Formula: C<sub>28</sub>H<sub>46</sub>O CAS: 2465-11-4 MolWeight: 398 RefIndex: 0

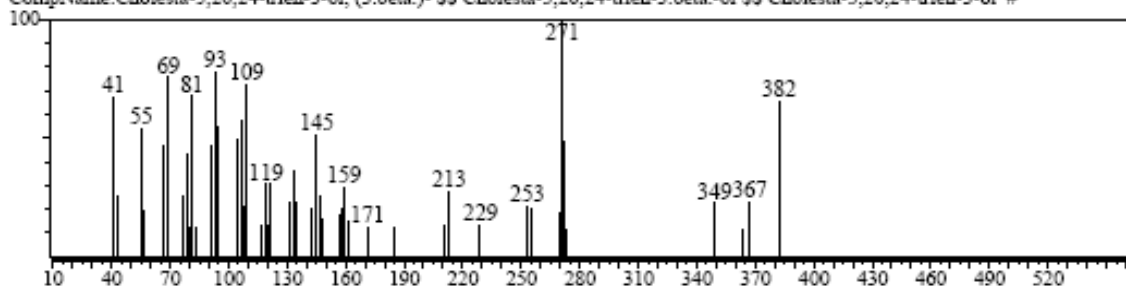
CompName: Ergosta-7,22-dien-3-ol, (3.beta.,5.alpha.,22E)- \$\$ 5.alpha.-Ergosta-7,22-dien-3.beta.-ol



Hit# 2 Entry: 367772 Library: WILEY7N2.LIB

SI: 78 Formula: C<sub>27</sub>H<sub>42</sub>O CAS: 41083-97-0 MolWeight: 382 RefIndex: 0

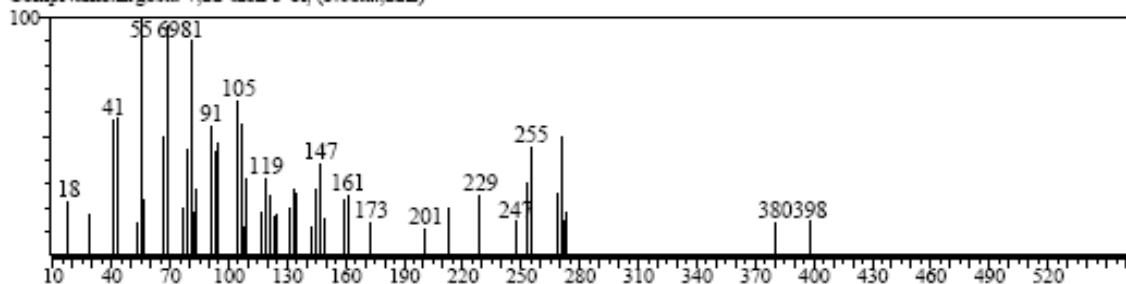
CompName: Cholesta-5,20,24-trien-3-ol, (3.beta.)- \$\$ Cholesta-5,20,24-trien-3.beta.-ol \$\$ Cholesta-5,20,24-trien-3-ol #



Hit# 3 Entry: 378840 Library: WILEY7N2.LIB

SI: 78 Formula: C<sub>28</sub>H<sub>46</sub>O CAS: 17608-76-3 MolWeight: 398 RefIndex: 0

CompName: Ergosta-7,22-dien-3-ol, (3.beta.,22E)-



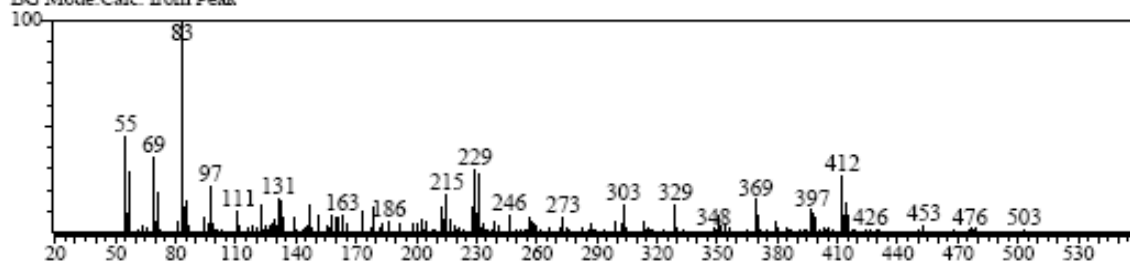
- **Pico 15**

<< Target >>

Line#:15 R.Time:28.833(Scan#:3101) MassPeaks:215

RawMode:Averaged 28.825-28.842(3100-3102) BasePeak:83.10(31491)

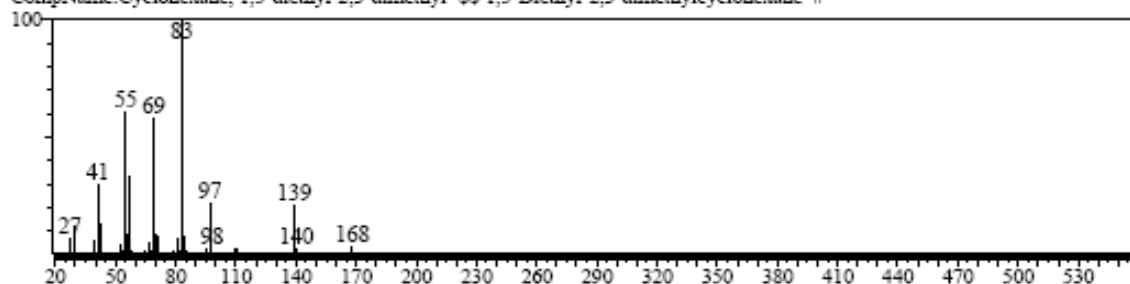
BG Mode:Calc. from Peak



Hit#1 Entry:78112 Library:WILEY7N2.LIB

SI:53 Formula:C12H24 CAS:74663-66-4 MolWeight:168 RetIndex:0

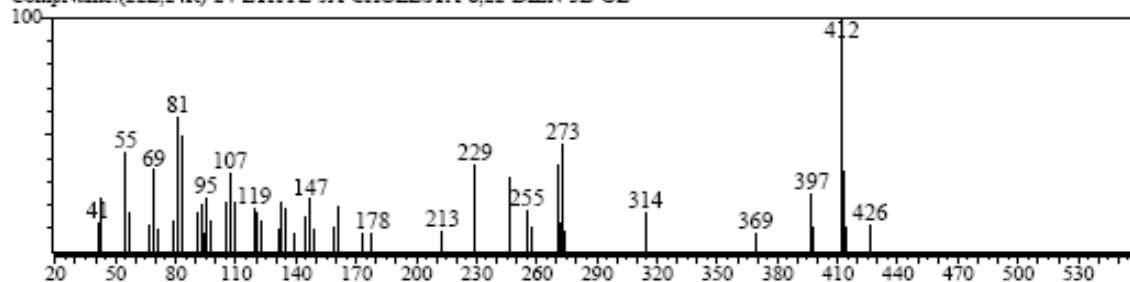
CompName:Cyclohexane, 1,5-diethyl-2,3-dimethyl- §§ 1,5-Diethyl-2,3-dimethylcyclohexane #



Hit#2 Entry:387038 Library:WILEY7N2.LIB

SI:52 Formula:C29H48O CAS:85733-80-8 MolWeight:412 RetIndex:0

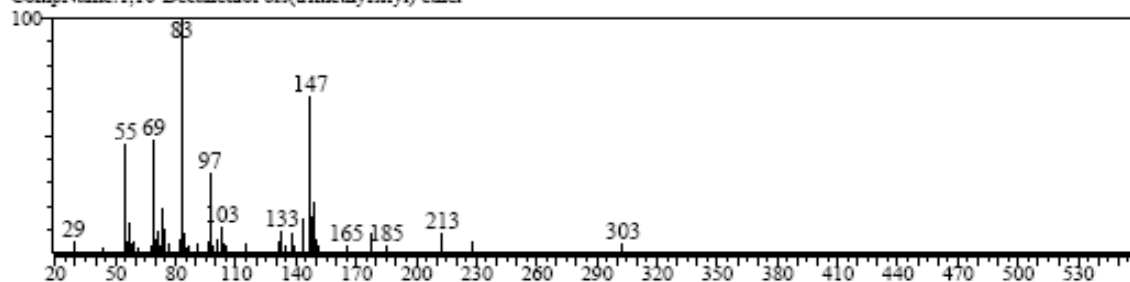
CompName:(22E,24R)-24-ETHYL-5A-CHOLESTA-8,22-DIEN-3B-OL



Hit#3 Entry:304745 Library:WILEY7N2.LIB

SI:52 Formula:C16H38O2Si2 CAS:18546-99-1 MolWeight:318 RetIndex:0

CompName:1,10-Decanediol bis(trimethylsilyl) ether



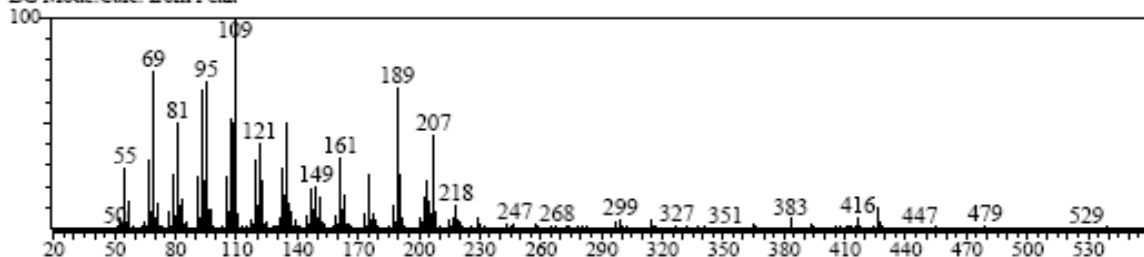
- **Pico 16**

<< Target >>

Line#:16 R.Time:29.192(Scan#:3144) MassPeaks:283

RawMode:Averaged 29.183-29.200(3143-3145) BasePeak:109.10(174469)

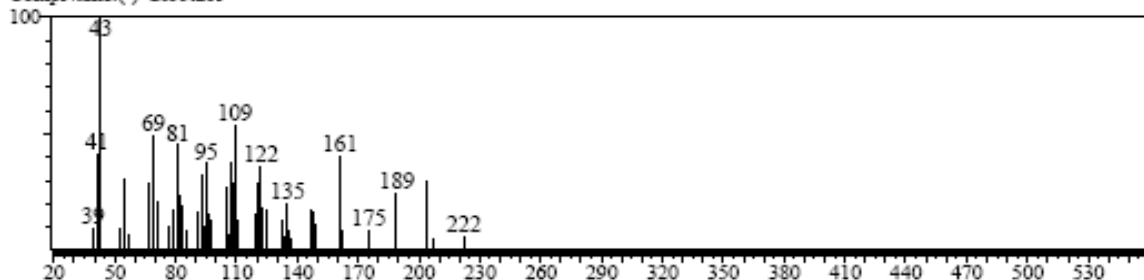
BG Mode:Calc. from Peak



Hit#1 Entry:164299 Library:WILEY7N2.LIB

SI:82 Formula:C15H26O CAS:489-41-8 MolWeight:222 RetIndex:0

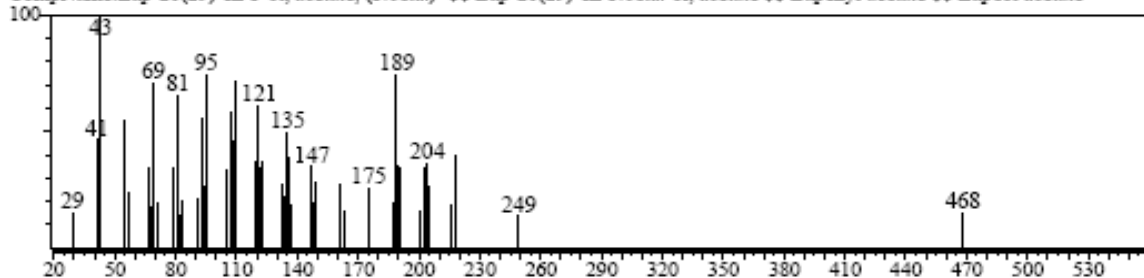
CompName:(-)-Globulol



Hit#2 Entry:410155 Library:WILEY7N2.LIB

SI:82 Formula:C32H52O2 CAS:1617-68-1 MolWeight:468 RetIndex:0

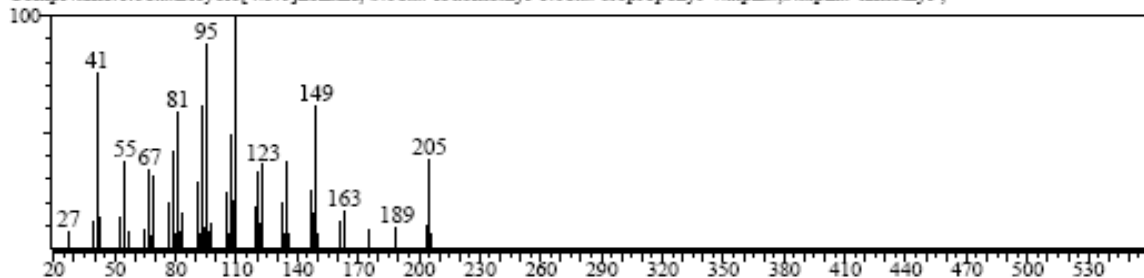
CompName:Lup-20(29)-en-3-ol, acetate, (3.beta.)- \$\$ Lup-20(29)-en-3.beta.-ol, acetate \$\$ Lupenyl acetate \$\$ Lupeol acetate



Hit#3 Entry:320911 Library:WILEY7N2.LIB

SI:81 Formula:C15H25I CAS:0-00-0 MolWeight:332 RetIndex:0

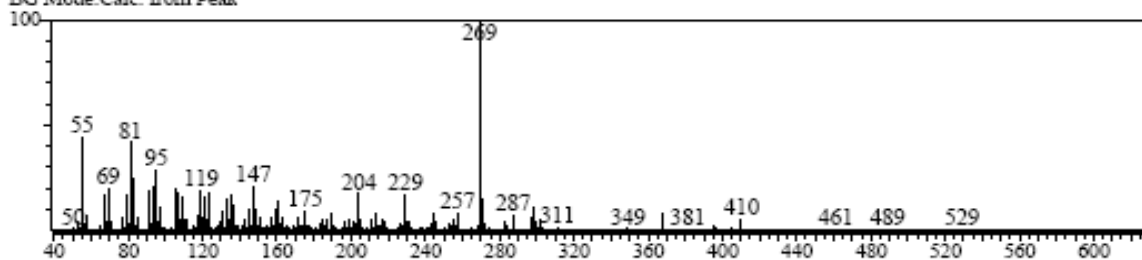
CompName:6.beta.Bicyclo[4.3.0]nonane, 5.beta.-iodomethyl-1.beta.-isopropenyl-4.alpha.,5.alpha.-dimethyl-,



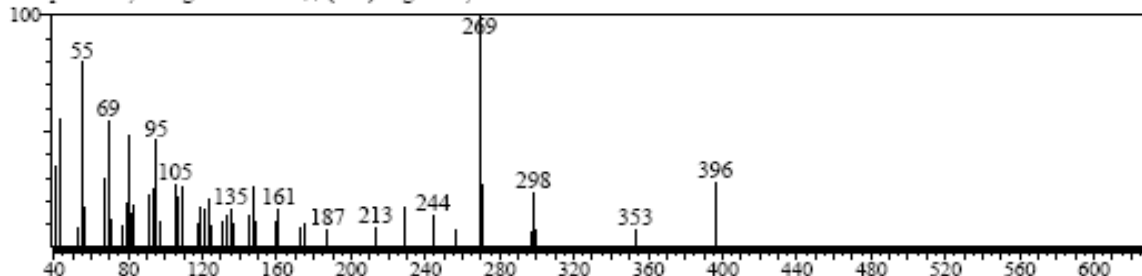
- **Pico 17**

<< Target >>

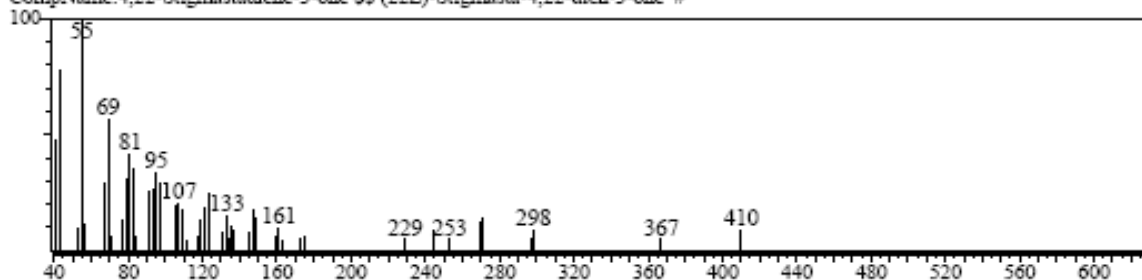
Line#:17 R.Time:29.358(Scan#:3164) MassPeaks:306  
RawMode:Averaged 29.350-29.367(3163-3165) BasePeak:269.10(383763)  
BG Mode:Calc. from Peak



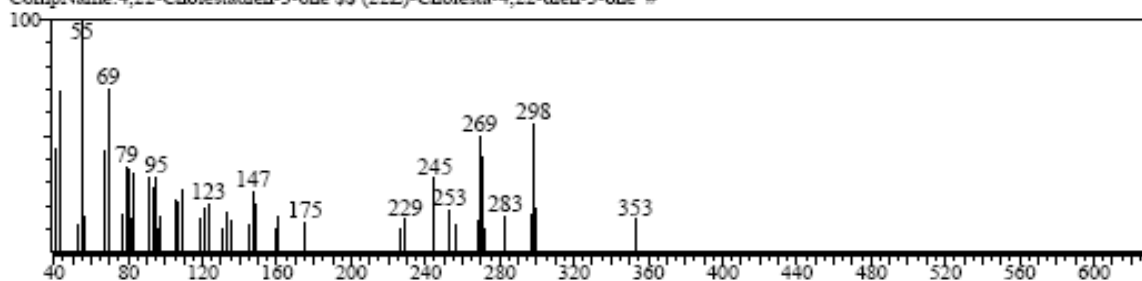
Hit#1 Entry:377538 Library:WILEY7N2.LIB  
SI:84 Formula:C28H44O CAS:32507-77-0 MolWeight:396 RefIndex:0  
CompName:7,22-Ergostadienone \$\$ (22E)-Ergosta-7,22-dien-3-one #



Hit#2 Entry:385871 Library:WILEY7N2.LIB  
SI:79 Formula:C29H46O CAS:20817-72-5 MolWeight:410 RefIndex:0  
CompName:4,22-Stigmastadiene-3-one \$\$ (22E)-Stigmasta-4,22-dien-3-one #



Hit#3 Entry:367784 Library:WILEY7N2.LIB  
SI:74 Formula:C27H42O CAS:55688-43-2 MolWeight:382 RefIndex:0  
CompName:4,22-Cholestadien-3-one \$\$ (22Z)-Cholesta-4,22-dien-3-one #



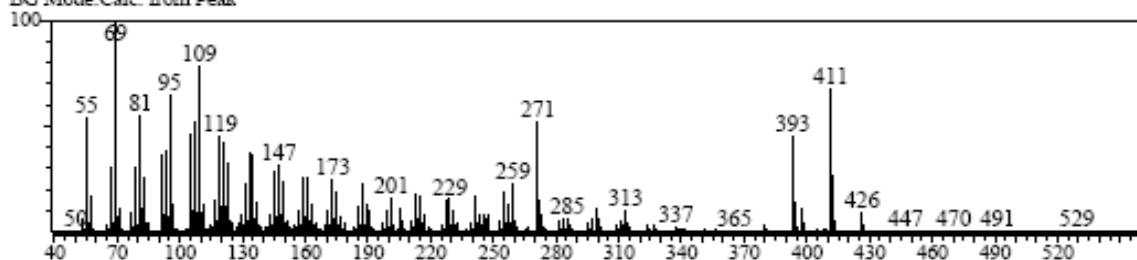
- **Pico 18**

<< Target >>

Line#18 R.Time:29.483(Scan#:3179) MassPeaks:360

RawMode:Averaged 29.475-29.492(3178-3180) BasePeak:69.05(489781)

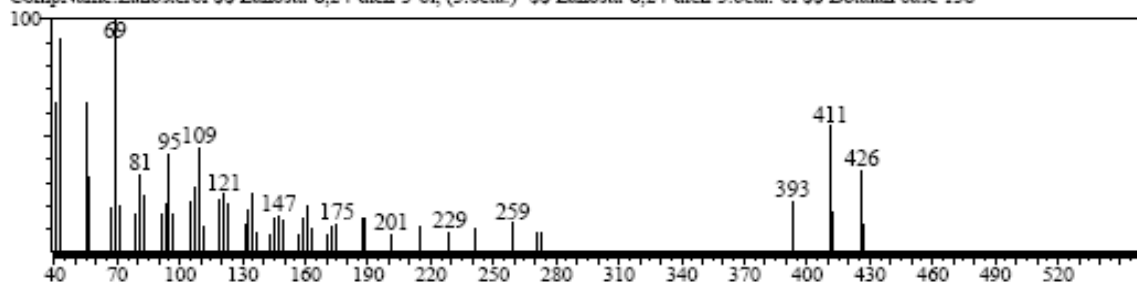
BG Mode:Calc. from Peak



Hit#1 Entry:394311 Library:WILEY7N2.LIB

SI:80 Formula:C30H50O CAS:79-63-0 MolWeight:426 RefIndex:0

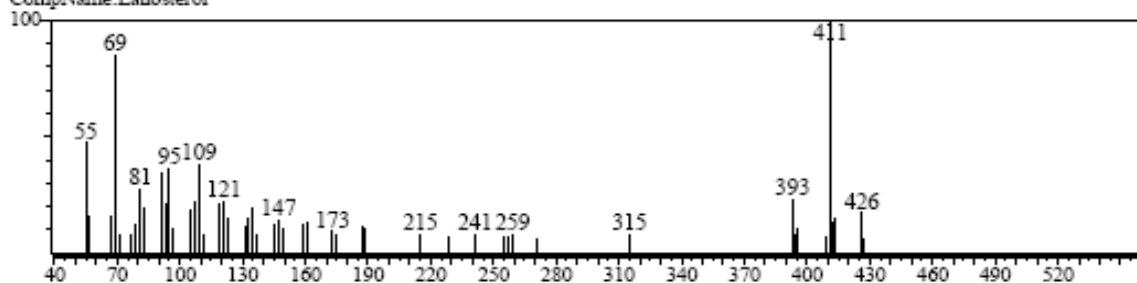
CompName:Lanosterol \$\$ Lanosta-8,24-dien-3-ol, (3.beta.)- \$\$ Lanosta-8,24-dien-3.beta.-ol \$\$ Botolan base 138



Hit#2 Entry:394312 Library:WILEY7N2.LIB

SI:79 Formula:C30H50O CAS:79-63-0 MolWeight:426 RefIndex:0

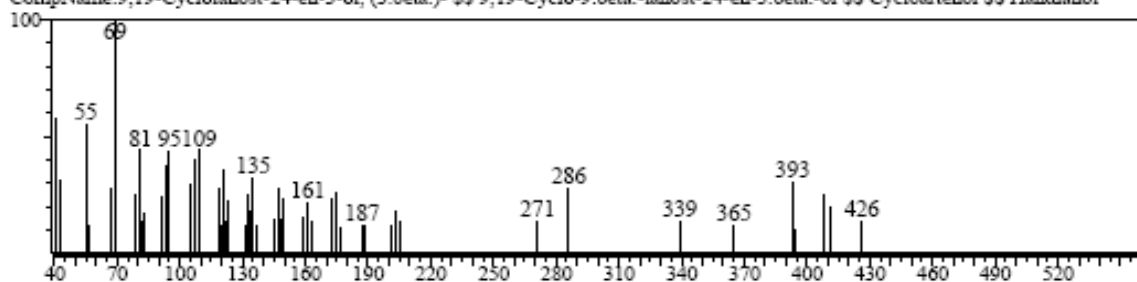
CompName:Lanosterol



Hit#3 Entry:394305 Library:WILEY7N2.LIB

SI:78 Formula:C30H50O CAS:469-38-5 MolWeight:426 RefIndex:0

CompName:9,19-Cyclolanost-24-en-3-ol, (3.beta.)- \$\$ 9,19-Cyclo-9.beta.-lanost-24-en-3.beta.-ol \$\$ Cycloartenol \$\$ Handianol



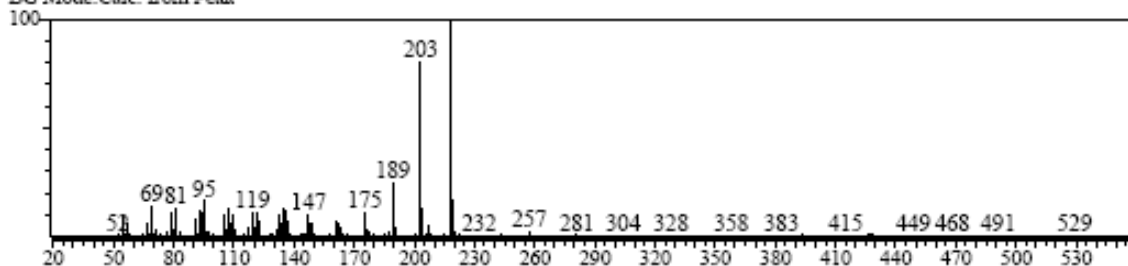
- **Pico 19**

<< Target >>

Line#:19 R.Time:29.617(Scan#:3195) MassPeaks:246

RawMode:Averaged 29.608-29.625(3194-3196) BasePeak:218.15(264232)

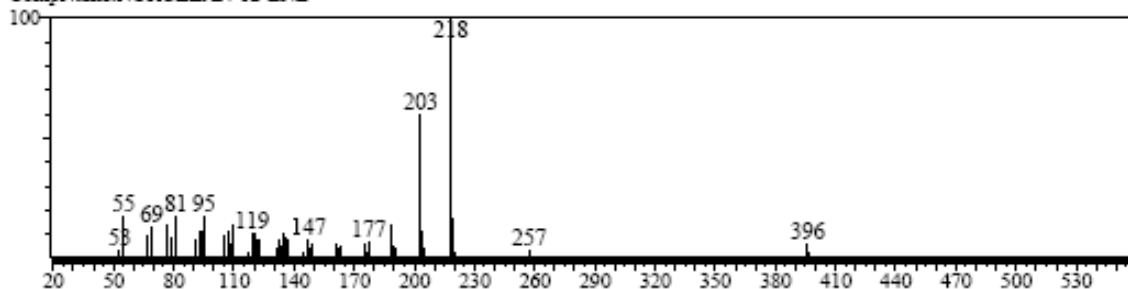
BG Mode:Calc. from Peak



Hit#1 Entry:377545 Library:WILEY7N2.LIB

SI:89 Formula:C29H48 CAS:0-00-0 MolWeight:396 RetIndex:0

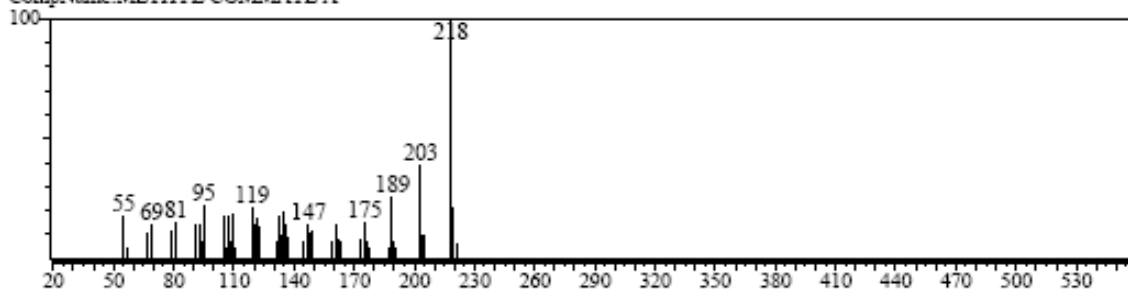
CompName:NOROLEAN-12-ENE



Hit#2 Entry:418347 Library:WILEY7N2.LIB

SI:86 Formula:C32H52O4 CAS:0-00-0 MolWeight:500 RetIndex:0

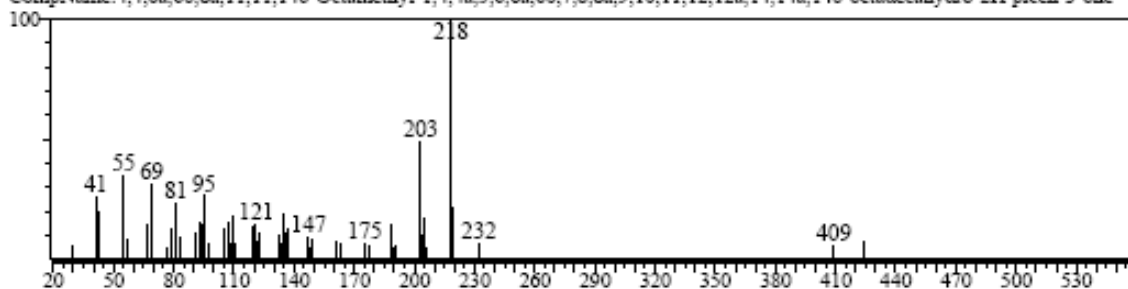
CompName:METHYL COMMATE A



Hit#3 Entry:393411 Library:WILEY7N2.LIB

SI:85 Formula:C30H48O CAS:0-00-0 MolWeight:424 RetIndex:0

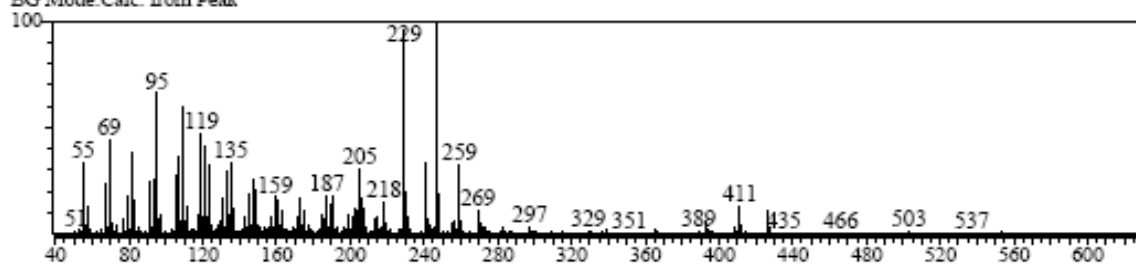
CompName:4,4,6a,6b,8a,11,11,14b-Octamethyl-1,4,4a,5,6,6a,6b,7,8,8a,9,10,11,12,12a,14,14a,14b-octadecahydro-2H-picen-3-one



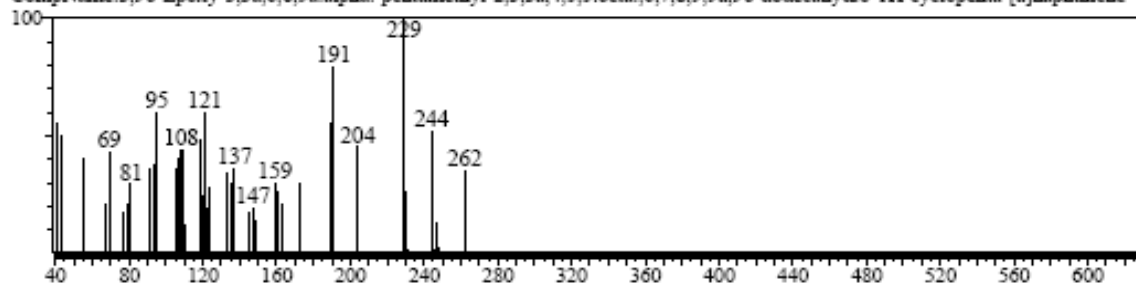
- **Pico 20**

<< Target >>

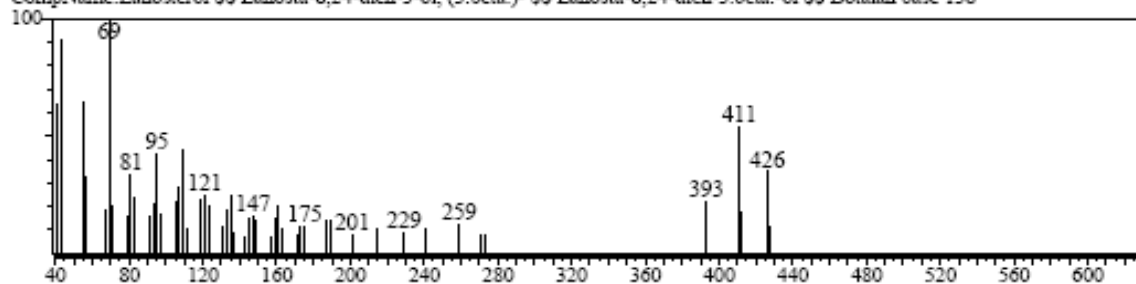
Line#:20 R.Time:30.108(Scan#:3254) MassPeaks:311  
RawMode:Averaged 30.100-30.117(3253-3255) BasePeak:247.15(169769)  
BG Mode:Calc. from Peak



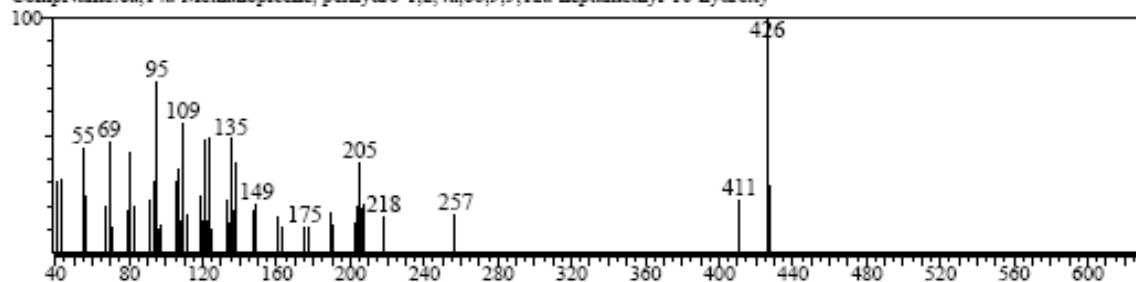
Hit#1 Entry:227290 Library:WILEY7N2.LIB  
SI:71 Formula:C18H30O CAS:74111-54-9 MolWeight:262 RetIndex:0  
CompName:3,9b-Epoxy-3,3a,6,6,9a.alpha.-pentamethyl-2,3,3a,4,5,5.beta.,6,7,8,9,9a,9b-dodecahydro-1H-cyclopenta-[a]naphthylene



Hit#2 Entry:394311 Library:WILEY7N2.LIB  
SI:70 Formula:C30H50O CAS:79-63-0 MolWeight:426 RetIndex:0  
CompName:Lanosterol \$\$ Lanosta-8,24-dien-3-ol, (3.beta.)- \$\$ Lanosta-8,24-dien-3.beta.-ol \$\$ Botolan base 138



Hit#3 Entry:394404 Library:WILEY7N2.LIB  
SI:70 Formula:C30H50O CAS:0-00-0 MolWeight:426 RetIndex:0  
CompName:6a,14a-Methanoplicene, perhydro-1,2,4a,6b,9,9,12a-heptamethyl-10-hydroxy-



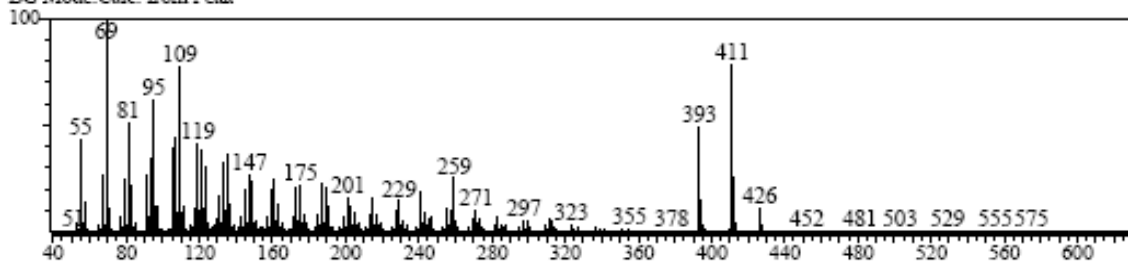
- **Pico 21**

<< Target >>

Line#:21 R.Time:30.292(Scan#:3276) MassPeaks:363

RawMode:Averaged 30.283-30.300(3275-3277) BasePeak:69.05(549136)

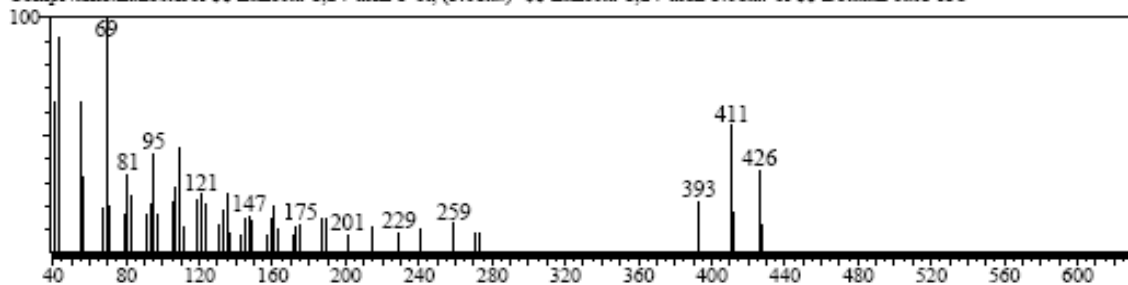
BG Mode:Calc. from Peak



Hit#1 Entry:394311 Library:WILEY7N2.LIB

SI:85 Formula:C30H50O CAS:79-63-0 MolWeight:426 RetIndex:0

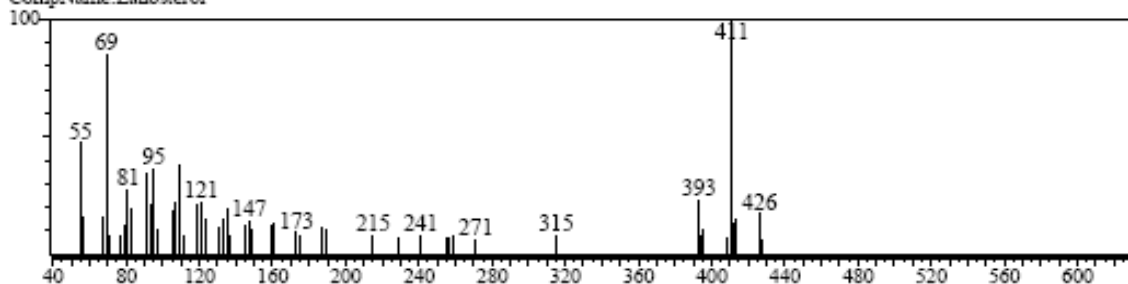
CompName:Lanosterol \$\$ Lanosta-8,24-dien-3-ol, (3.beta.)- \$\$ Lanosta-8,24-dien-3.beta.-ol \$\$ Botolan base 138



Hit#2 Entry:394312 Library:WILEY7N2.LIB

SI:82 Formula:C30H50O CAS:79-63-0 MolWeight:426 RetIndex:0

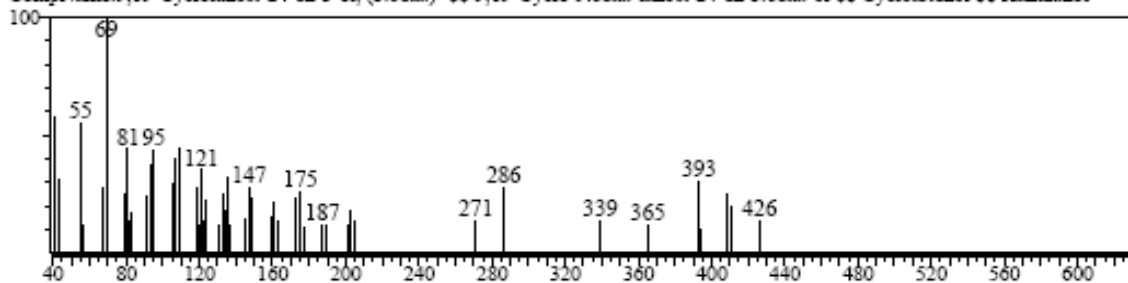
CompName:Lanosterol



Hit#3 Entry:394305 Library:WILEY7N2.LIB

SI:81 Formula:C30H50O CAS:469-38-5 MolWeight:426 RetIndex:0

CompName:9,19-Cyclolanost-24-en-3-ol, (3.beta.)- \$\$ 9,19-Cyclo-9.beta.-lanost-24-en-3.beta.-ol \$\$ Cycloartenol \$\$ Handianol

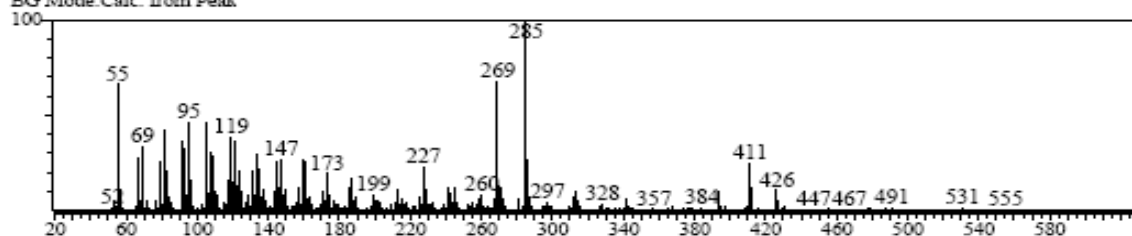




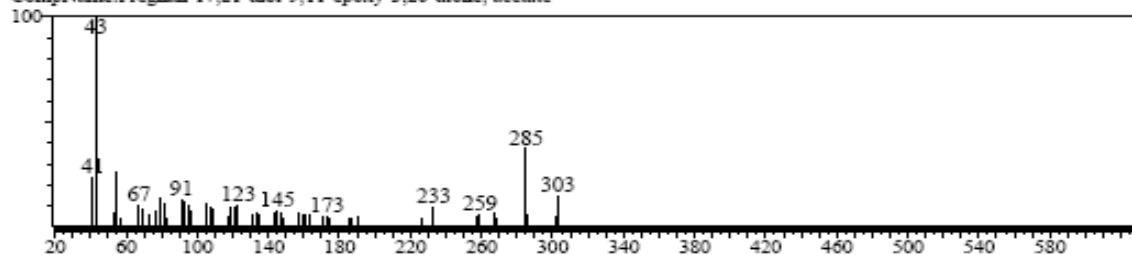
- **Pico 22**

<< Target >>

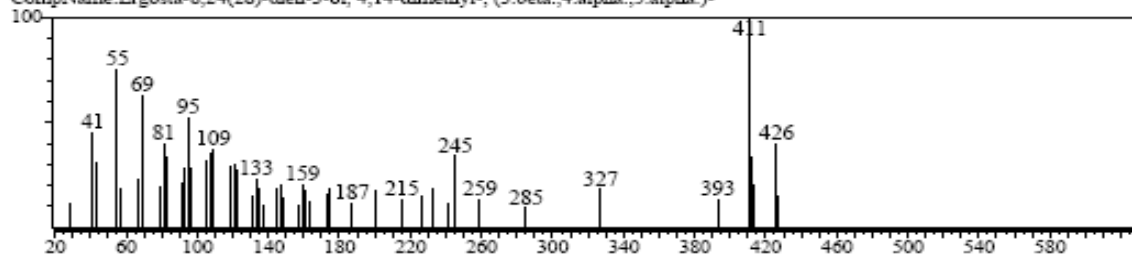
Line#:22 R.Time:30.650(Scan#:3319) MassPeaks:297  
RawMode:Averaged 30.642-30.658(3318-3320) BasePeak:285.15(80852)  
BG Mode:Calc. from Peak



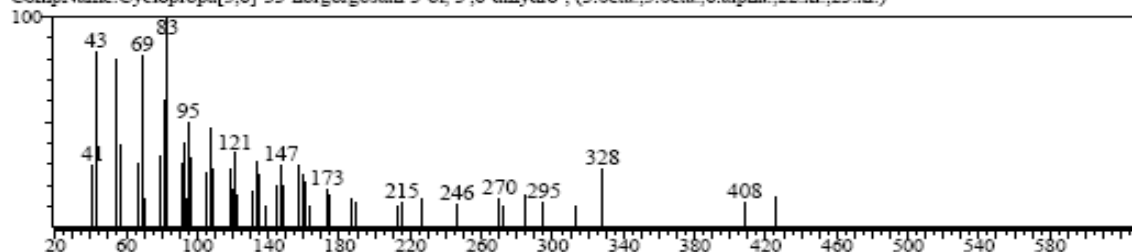
Hit#:1 Entry:382464 Library:WILEY7N2.LIB  
SI:75 Formula:C23H32O6 CAS:0-00-0 MolWeight:404 RetIndex:0  
CompName:Pregnan-17,21-diol-9,11-epoxy-3,20-dione, acetate



Hit#:2 Entry:394309 Library:WILEY7N2.LIB  
SI:74 Formula:C30H50O CAS:16910-32-0 MolWeight:426 RetIndex:0  
CompName:Ergosta-8,24(28)-dien-3-ol, 4,14-dimethyl-, (3.beta.,4.alpha.,5.alpha.)-



Hit#:3 Entry:394265 Library:WILEY7N2.LIB  
SI:74 Formula:C30H50O CAS:53761-94-7 MolWeight:426 RetIndex:0  
CompName:Cyclopropa[5,6]-33-norgorgostan-3-ol, 3',6'-dihydro-, (3.beta.,5.beta.,6.alpha.,22.xi.,23.xi.)-



**Figura 27.** Espectro de masas de compuestos identificados y su comparación con la librería del equipo.

## 7- BIBLIOGRAFÍA

1. JEFREY, C. 1992. Names of the indigenous neotropical species of *Luffa* Mill. (cucurbitaceae). Kew Bulletin 47(4):741-742.
2. VILLEGAS, G; BOLAÑOS, A; MIRANDA, J; ZENÓN, A; Flora Nectarífera y polínifera del estado de Chiapas, Secretaría de agricultura, ganadería y desarrollo rural; Primera Edición, Marzo del 2000; México.
3. TOKIOKA, K; KISHIMOTO, S; Cosmetic, Agos. 2001 [Citada 9 de Abril de 2008] (Cosméticos). Disponible en Internet: < ep.espacenet.com >.
4. MATSUMOTO, M; KOBAYASHI, Y; Preparation for External use for skin, Feb. 2000 [Citada 9 de Abril de 2008] (Preparación para uso externo en la piel). Disponible en Internet: <ep.espacenet.com >.
5. MURAI, A; Cosmetic for growing and raising hair, Feb. 1995 [Citada 9 de abril de 2008] (Cosmético para el aumento y crecida del cabello). Disponible en Internet: < ep.espacenet.com >.
6. LINTNER, K; Use of luffa cylindrica oil in cosmetic and dermopharmaceutical compositions, Mar. 2003 [Citada 9 de Abril de 2008] (Uso del aceite de la Luffa Cylindrica en cosmético y composición dermofamaceutica). Disponible en Internet: < ep.espacenet.com >.
7. AMAYA, L; DIAZ, F; Extracción y caracterización del aceite de las semillas de *Luffa Cylindrica* procedentes de dos departamentos del país con y sin beneficio. Pereira 2005. Tesis de grado. Universidad Tecnológica de Pereira. Facultad de Tecnologías
8. GARCIA, N; MONCADA, M; Estudio microbiológico del aceite de *Luffa Cylindrica* para su potencial uso en la industria cosmética. Pereira 2006. Tesis de grado. Universidad Tecnológica de Pereira. Facultad de Tecnologías.
9. Información suministrada por ESTROCOL.ESCOBAR, Oscar Fernando. Director administrativo y comercial. Cl. 23 No 6-43. Tel: 3254456.
10. VARADY, A; HOUWELING, A; JONES, M; Effects of plant sterols and exercise training on cholesterol absorption and synthesis in previously

sedentary hypercholesterolemic subjects. Montreal, Quebec, Canada (2007), 1-9.

11. ECOESPON. Luffa, sponge gourd, Chinese Okra, (1999-2002) [citada 17 de enero de 2009]. Disponible en Internet: <www.ecoespon.com>.
12. Revista trimestral del Instituto Colombiano Agropecuario, N° 2.
13. Norma Técnica colombiana (NTC 4833), Industria de cosméticos y de tocados. Métodos de ensayo microbiológicos para productos cosméticos, Editada por el instituto Colombino de Normas Técnicas y Certificación (ICONTEC), Bogotá, D.C.
14. McMURRY, J; Química Orgánica 2006. Editorial: Pedro de la Garza Rosales. Sexta edición (1027-1053).
15. ORTIZ, A; Atlas de química, Lípidos.1988. Editorial: THEMA. Buenos Aires, 60-08036 Barcelona. 82 – 83.
16. FESSENDEN, R; FESSENDEN, J; Química Orgánica. Grasas y Aceites. 1982. Editorial: Grupo editorial iberoamericana. 896 – 898.
17. MATISSEK, R; SCHNEPEL, F; STEINER, G; Análisis de alimentos. Editorial Acribia S.A., Segunda Edición España. 1998.
18. FERNANDEZ, P; CABRAL, J; Phytoesterol: Applications and recovery methods. Bioresource Technology 98 (2007) 2335–2350.
19. FIERR, A; VASQUEZ, Y; REYES, M; SEPULVEDA, S; Determinación cuantitativa del  $\beta$ -sitosterol presentes en vegetales de la dieta. Posibles complicaciones para su uso preventivo en poblaciones susceptibles. Laboratorio de química medica y ensayos biológicos 01 (2004), 1-6.
20. JIA, X; EBINEA, N; WANGB, Y; AWADC, A; JONES, P; Effects of different phytoesterol analogs on clonic mucosal cell proliferation in hamsters. Journal of nutritional biochemistry 17 (2006), 396-401.
21. GUDERIAN, D; RASMUSSEN, H; WRAY, C; DUSSAULT, P; CARR, T. Cholesterol-lowering properties of plant. Sterol sterified with beef tallow fatty acids in hamsters. Department of nutrition an health sciences. University of Nebraska 16 (2006), 1-6.

22. PARD, V; La importancia de las vitaminas en la nutrición de personas que realizan actividad físico deportiva. *Revista Internacional de medicina y ciencias de la actividad física y el deporte* No 16 (2004).
23. ZHANG, F; NUNES, M; SEGMULLER, B; DUNPHY, R; HESSE, R; SRINIVASETTY, S; Degradation chemistry of a Vitamin D analogue (ecalcidene) investigated by HPLC–MS, HPLC–NMR and chemical derivatization. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 40 (2006), 850–863.
24. ALADAG, I; GUVEN, M; EYIBILEN, A; SAHIN, S; KO"SEOGLU, D; Efficacy of vitamin A in experimentally induced acute otitis media. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology* 71 (2007), 623—628.
25. LARSEN, M; PEDERSEN, R; TAARNHØJ, N; SPITS, Y; MUNCH, I; LEROY, B; KLEMP, K; Retinal vessel dilation following repletion of vitamin A deficiency. *Experimental Eye Research* 82 (2006), 349–350.
26. SOOK, J; BURRIB, B; QUANA, Z; NEIDLINGERC, T; Extraction and chromatography of carotenoids from pumpkin. *Journal of Chromatography A*, 1073 (2005) 371–375.
27. Branka, I; SNE, D; MARKOVIĆ, A; Combined effects of coenzyme Q10 and Vitamin E in cadmium induced alterations of antioxidant defense system in the rat heart. *Institute of Biology and Ecology, Faculty of Science, University of Kragujevac, Radoja Domanovića 12, P.O. Box 60, 34000 Kragujevac, Serbia and Montenegro* (2006) 219–224.
28. PODSEDEK, A; Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review. *LWT* 40 (2007) 1–11.
29. ESTÉVEZ, M; VENTANAS, S; CAVA, R; Oxidation of lipids and proteins in frankfurters with different fatty acid compositions and tocopherol and phenolic contents. *Food Chemistry* 100 (2007) 55–63.
30. ORAL, E; ROWELLA, S; MURATOGLU, O; The effect of  $\alpha$ -tocopherol on the oxidation and free radical decay in irradiated UHMWPE. *Biomaterials* 27 (2006) 5580–5587.
31. KYU, I; RIMAB, J; LING, C; LI, Q; Spectrofluorometric and high-performance liquid chromatographic determination of all-rac- $\alpha$ -tocopheryl acetate in virgin olive oil. *Journal of Food Composition and Analysis* 20 (2007) 57–62.

32. AJITH, T; USHA, S; INVITA, V; Ascorbic acid and  $\alpha$ -tocopherol protect anticancer drug cisplatin induced nephrotoxicity in mice: a comparative study. *Clinica Chimica Acta* 375 (2007) 82–86.
33. BOLLE, P; EVANDRI, M; SASO, L; The controversial efficacy of vitamin E for human male infertility. *Contraception* 65 (2002), 313–315.
34. HIDIROGLOU, N; GILANI, S; LONG, L; MADERE, R; The influence of dietary vitamin E, fat, and methionine on blood cholesterol profile, homocysteine levels, and oxidizability of low density lipoprotein in the gerbil. Nutrition Research Division, Food Directorate, Health Products and Food Branch, Health Canada, Banting Research Centre (AL 2203C). (2004), 730– 740.
35. RAO, A; RAO, L; Carotenoids and human health. Department of nutritional science, faculty of medicine. University of Toronto. Canada (2007), 1-10.
36. MATISSEK, R; SCHNEPEL, F; STEINER, G; Análisis de alimentos. Editorial Acribia S. A., Segunda Edición. España. 1998.
37. HAMILTON, R; HAMILTON, S; Thin layer chromatography. Analytical chemistry by open learning. London. 1987.
38. CHOROM, P; Cromatografía en capa fina, ene. 2008 [Citada 20 de enero de 2009]. Disponible en internet <[www.textoscientificos.com](http://www.textoscientificos.com)>.
39. SKOOG, D; HOLLER, F; NIEMAN, T; Principios de análisis instrumental. Quinta Edición. McGraw-Hill. España. 2001.
40. RUBINSON, K; RUBINSON, J; Análisis instrumental. Pearson Educación, S. A. Madrid (2001).
41. ISAZA, J; Extracción en fase sólida. Fundamentos y desarrollo de aplicaciones. Escuela de tecnología química. Universidad Tecnológica de Pereira.
42. Norma Colombiana ICONTEC NTC 235-2. Grasas y aceites animales y vegetales. Determinación de la materia insaponificable. Método de extracción con Hexano. Instituto Colombiano de Normas Técnicas. Santa Fe de Bogotá. 2002.
43. PICARD, H; GUYOT, B; VINCENT, J; Café cacao thé. Vol. XXVIII, n<sup>o</sup> 1. Laoratoire de chimie et de technologie. Institut de recherché du café, du cacao el aures plantes stimulantes. France. 1984.

44. HERRERA, E; Obtención y Caracterización de la materia insaponificable del aceite de crisálida de *Bombyx mori* L. Híbrido Pilamo I. Pereira 2007. Tesis de grado. Universidad Tecnológica de Pereira. Facultad de Tecnologías.
45. PASCUAL, B; VILCHIS, M; ÁLVAREZ, T; MÁRQUEZ, M; Caracterización del Aceite Obtenido de Almendras de Diferentes Variedades de Mango y su Aplicación como Sustituto de Manteca de Cacao en Rellenos y Coberturas de Chocolate. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. c.p. 04510, México, D.F.
46. PROQUIMCOL; Aceite de castor. Feb. 2009 [Citada 15 de enero de 2009]. Disponible en internet <[www.proquimcol.com](http://www.proquimcol.com)>.
47. PRICO, J; Concepto actual de la capacidad sensibilizante de la lanolina. Cátedra de dermatología de la escuela de medicina "Luis Razetti". Universidad central de Venezuela. Caracas.
48. PORTERO, F; Radiación ultravioleta. Cátedra de dermatología de la escuela de medicina "Luis Razetti". Universidad central de Venezuela. Caracas.
49. LAGARDA, M.; GARCÍA, G.; FARRÉ, R. Analysis of phytosterols in foods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 41 (2006) 1486–1496.
50. CAÑABATE, B.; SEGURA, A.; FERNÁNDEZ, A.; BELMONTE, A.; FRENICH, G.; MARTÍNEZ, J.; DURAN, J. Separation and determination of sterols in olive oil by HPLC-MS. *Food Chemistry* 102 (2007) 593–598.
51. MIAO, X.; METCALFE, C. Determination of cholesterol-lowering statin drugs in aqueous samples using liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 998 (2003) 133–141.
52. PENG, S.; MORIN, R. Biological Effects of Cholesterol Oxides, *CRC Press*, Boca Raton. SA, 1992.
53. BUSTAMANTE, M.; DELGADO, M.; SÁNCHEZ, A.; CARABIAS, R. Determination of tocopherols and tocotrienols in cereals by pressurized liquid extraction–liquid chromatography–mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 587 (2007), 216–221.

54. FERNÁNDEZ, J.; AGUILAR, M.; PINEDA, M. Caracterización de aceites de oliva vírgenes de la provincia de Córdoba y uso de antioxidantes como marcadores de autenticación. Dpto. Biología Vegetal. Universidad de Córdoba. España (2001).
55. RODRÍGUEZ, M.; GARCÍA, M.; LÓPEZ, M.; SIMAL, J. Bebidas enriquecidas con antioxidantes: Aspectos Legales y etiquetado nutricional. *Cienc. Tecnol. Aliment.* Vol 3, No. 3 (2001) pp. 173-179.
56. FUNDACIÓN NUCIS. Los frutos secos en el contexto de la dieta mediterránea. Agos 2008 [Citada 20 de agosto de 2008] Disponible en Internet < <http://www.nucis.org> >.
57. GONZALES, J.; BROWN, P. Nile tilapia *Oreochromis niloticus* as a food source in advanced life support systems: Initial considerations. *Advances in Space Research* 38 (2006) 1132–1137.
58. YUUCHI, S; UCHIDA, Y; FUJIKAWA, A; Food containing substance of saponin of *Luffa Cylindrica*, Nov. 1984 [Citada 9 de Abril de 2008] (Comida con contenido de sustancia saponificable proveniente de la *Luffa Cylindrica*). Disponible en Internet < [ep.espacenet.com](http://ep.espacenet.com) >.
59. GUARATINI, T.; GIANETTI, M.; CAMPOS, P. Stability of cosmetic formulations containing esters of Vitamins E and A: Chemical and physical aspects. *International Journal of Pharmaceutics* 327 (2006) 12–16.
60. RIVEROS, H; SANCHEZ, A; Vitaminas en los cosméticos, Agos 2008 [Citada 20 de Agosto de 2008]. Disponible en Internet < <http://laguna.fmedic.unam.mx> >.
61. RIVEROS, H.; SÁNCHEZ, A. Vitaminas en los cosméticos, Agos 2008 [Citada 20 de Agosto de 2008]. Disponible en Internet < <http://www.mujeractual.com> >.
62. BOWLER, P. Acetato de Tocoferol, Agos 2008 [Citada 20 de Agosto de 2008]. Disponible en Internet < <http://www.netdoctor.es> >.
63. SALINAS, N; DELAHAYE, E; Pigmentos carotenoides identificados y purificados en aceite de palma. Facultad experimental de ciencias y tecnología. Venezuela. 2003.